

**Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**

**ÉLELMISZER-BIZTONSÁGI SZEMPONTBÓL JELENTŐS BAKTÉRIUMOK
KIMUTATÁSA, PCR-ALAPÚ MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA ÉS TÍPIZÁLÁSA**

Belák Ágnes

Doktori értekezés

Budapest
2009

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola


tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Fodor Péter, DSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: Maráz Anna, CSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.


.....
Az iskolavezető jóváhagyása


.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2009. június 9-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Kériné Borsodi Andrea, PhD

Kiss István, DSc

Micsinai Adrienn, PhD

Szeitzné Szabó Mária, PhD

Opponensek

Kovács Gábor, PhD

Lehoczkiné Tornai Judit, CSc

Titkár

Pomázi Andrea, CSc

*„Fontold meg jól, mit teszel;
válaszd meg az eszközöket okosságod szerint;
munkálj fáradatlanul...”*

(Kölcsey Ferenc)

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	i
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	iv
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1. Az élelmiszer-biztonság és jogszabályi háttere.....	3
2.2. Az élelmiszer-biztonságot befolyásoló tényezők	4
2.3. Állati eredetű élelmiszerek élelmiszer-biztonsági vonatkozásai.....	4
2.3.1. Nyers húsok mikrobiológiai biztonsági kérdései.....	5
2.3.2. Tejtermékek mikrobiológiai biztonsági kérdései.....	7
2.4. Élelmiszer-biztonsági szempontból fontos patogén baktériumok.....	8
2.4.1. Az <i>Escherichia coli</i> faj patogén változatai.....	9
2.4.2. <i>Campylobacter</i> fajok.....	12
2.4.2.1. A termofil <i>Campylobacter</i> fajok jellemzése.....	13
2.4.2.2. Patogenitás és virulencia	16
2.4.2.3. A flagellum szerepe és jelentősége a virulenciában.....	20
2.5. Élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata, patogének kimutatása	21
2.5.1. Hagyományos mikrobiológiai módszerek.....	22
2.5.1.1. Termofil <i>Campylobacter</i> fajok kimutatása hagyományos módszerekkel	23
2.5.2. Alternatív és gyors mikrobiológiai módszerek.....	24
2.6. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős patogén baktériumok kimutatására alkalmazható molekuláris biológiai módszerek.....	26
2.6.1. Polimeráz láncreakció (PCR)	27
2.6.2. RFLP (restrikciós fragmentum hossz-polimorfizmus) és PCR-RFLP vizsgálatok ..	27
2.6.3. Véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS (RAPD) vizsgálat	29
2.6.4. Denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)	31
2.6.5. Heteroduplex mobilitási analízis (HMA).....	32
2.6.6. További molekuláris biológiai módszerek	33
2.6.7. <i>Campylobacter</i> fajok vizsgálatához alkalmazható molekuláris biológiai módszerek	34
2.7. A vizsgálati eredmények kiértékeléséhez és a módszerek összehasonlításához alkalmazható statisztikai módszerek	35
2.7.1. Főkomponens analízis.....	35
2.7.2. Klaszteranalízis.....	35
2.7.3. Simpson-féle diverzitás index	36
3. CÉLKITŰZÉSEK	38
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	39
4.1. Baktérium törzsek	39
4.2. Alkalmazott tápközegek	42
4.3. Alkalmazott oldatok	42
4.4. Egyéb anyagok	44
4.5. Módszerek.....	44
4.5.1. <i>Escherichia coli</i> törzsek izolálása és azonosítása tenyésztésen alapuló módszerekkel...	44
4.5.2. <i>Campylobacter</i> törzsek kimutatása és izolálása tenyésztésen alapuló módszerekkel	45

4.5.3. A <i>Campylobacter</i> törzsek dúsítási vizsgálata során az izolátumok tenyésztési körülményei	45
4.5.4. <i>Campylobacter</i> törzsek szaporodási görbéinek meghatározása	45
4.5.5. A <i>Campylobacter</i> törzsek dúsítási vizsgálata	46
4.5.6. Híppurát hidrolízis	47
4.5.7. Genomiális DNS izolálása PCR alapú molekuláris módszerekhez.....	47
4.5.8. Specifikus PCR reakciók alkalmazása.....	47
4.5.8.1. <i>Escherichia coli</i> törzsek vizsgálata duplex PCR segítségével	48
4.5.8.2. <i>Campylobacter</i> izolátumok azonosítása specifikus primerpárok segítségével	48
4.5.9. <i>Escherichia coli</i> izolátumok RAPD-PCR analízise.....	49
4.5.10. <i>Campylobacter</i> izolátumok RAPD-PCR módszerrel történő tipizálása	49
4.5.11. <i>Campylobacter</i> izolátumok rDNS-RFLP vizsgálata	50
4.5.12. <i>Campylobacter</i> izolátumok <i>flaA</i> -RFLP vizsgálata.....	51
4.5.13. <i>Campylobacter</i> izolátumok merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézissel (DGGE) történő vizsgálata	52
4.5.14. <i>Campylobacter</i> izolátumok párhuzamos denaturáló gradiens gélelektroforézissel történő vizsgálata	53
4.5.15. Heteroduplex mobilitási vizsgálat (HMA).....	54
4.5.16. Gélelektroforézis	55
4.5.17. <i>Campylobacter</i> izolátumok <i>flaA</i> - <i>flaB</i> intergénikus szekvenciájának bázisszrend meghatározása.....	55
4.5.18. Statisztikai módszerek a vizsgálati eredmények kiértékeléséhez.....	55
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK.....	56
5.1. <i>Escherichia coli</i> és <i>Campylobacter</i> törzsek izolálása élelmiszerekből	56
5.2. <i>Escherichia coli</i> törzsek molekuláris azonosítása és tipizálása	57
5.2.1. <i>Escherichia coli</i> izolátumok vizsgálata duplex PCR módszerrel.....	57
5.2.2. <i>Escherichia coli</i> izolátumok tipizálása RAPD-PCR analízissel.....	60
5.3. <i>Campylobacter jejuni</i> és <i>C. coli</i> törzsek kompetíciója szelektív dúsítás során	62
5.4. Élelmiszer-biztonsági jelentőségű <i>Campylobacter</i> fajok molekuláris biológiai vizsgálata	66
5.4.1. <i>Campylobacter</i> izolátumok faj színű azonosítása specifikus primerekkel	66
5.4.2. PCR-alapú molekuláris módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata <i>Campylobacter</i> izolátumok tipizálása céljából	69
5.4.2.1. <i>Campylobacter</i> izolátumok rDNS-RFLP vizsgálatának eredményei	69
5.4.2.2. <i>Campylobacter</i> izolátumok tipizálása <i>flaA</i> -RFLP vizsgálattal	72
5.4.2.3. <i>Campylobacter</i> izolátumok tipizálása denaturáló gradiens gélelektroforézissel.....	74
5.4.2.4. <i>Campylobacter</i> izolátumok vizsgálata heteroduplex mobilitási eljárással.....	77
5.4.2.5. A <i>Campylobacter</i> izolátumok <i>flaA</i> – <i>flaB</i> intergénikus régiójának (IGS) szekvencia polimorfizmusa.....	80
5.4.2.6. <i>Campylobacter</i> izolátumok tipizálása RAPD-PCR analízissel	82
5.4.2.7. A PCR alapú molekuláris módszerek összehasonlítása diszkriminációs képességük alapján.....	85
5.4.2.8. A molekuláris módszerek eredményeinek statisztikai értékelése.....	86
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK	87
6.1. A szelektív dúsítás hatása termofil <i>Campylobacter</i> törzsekre	87
6.2. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok azonosítása és tipizálása PCR alapú molekuláris módszerekkel.....	88
6.2.1. <i>Escherichia coli</i> izolátumok kimutatása és azonosítása duplex PCR módszerrel....	88
6.2.2. <i>Campylobacter</i> izolátumok vizsgálata PCR-alapú molekuláris biológiai módszerekkel	90

6.3. Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei	95
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	97
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	99
9. SUMMARY.....	102
10. IRODALOMJEGYZÉK	104
11. MELLÉKLET	126
11.1. Az eltérő PCR-alapú módszerekkel kapott tipizálási eredmények <i>Campylobacter coli</i> és <i>C. jejuni</i> izolátumok esetében	126
11.2. A vizsgált <i>Campylobacter</i> izolátumok <i>flaA</i> és <i>flaB</i> gének közötti intergénikus szekvenciájának nukleotid sorrendje.....	136

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (amplifikált fragmentum hossz polimorfizmus)

ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysⁱs (felszaporított rDNS restrikciós vizsgálata)

ATP: adenzin trifoszfát

bp: bázispár

C. coli: *Campylobacter coli*

C. jejuni: *Campylobacter jejuni*

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CDT: Cytolethal Distending Toxin (felfúvódásos sejthalált okozó toxin)

DEFT: Direct Epifluorescent Filter Technique (közvetlen epifluoreszcens szűrési eljárás)

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (denaturáló gradiens gélelektroforézis)

DK: denaturáló koncentráció

E. coli: *Escherichia coli*

EFSA: European Food Safety Agency (Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal)

EHEC: Enterohemorrágiás *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzimhez kötött immunszorbens eljárás)

HMA: Heteroduplex Mobility Assay (heteroduplex mobilitási vizsgálat)

IGS: Intergenic Sequ^ence (intergénikus szekvencia)

kbp: kilobázispár

PAA: Polyacrylamide (poliakrilamid)

MLST: Multilocus Sequ^ence Typing (multilókusz szekvencia tipizálás)

PCR: Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DN^A (véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS)

RFLP: Restriction Fragment Lenght Polymorphism (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus)

rDNS: riboszómális DNS

rRNS: riboszómális RNS

SSR: Simple Sequ^ence Repeat (egyszerű szekvencia ismétlődés)

STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (Shiga toxin-termelő *Escherichia coli*)

TEMED: N, N, N, N'-Tetra-Metil-Etiléndiamin

VBNC: Viable But Non-Culturable (élő, de nem tenyésztethető)

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat (eltérő számú tandem ismétlődés)

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer-biztonság napjaink egyik legfontosabb kérdése. A fogyasztók növekvő igénye a biztonságos, jó minőségű és egészséges élelmiszerek iránt fokozott kihívást jelent a termelők, a gyártók és a forgalmazók számára, ugyanakkor jelentős feladatot ró a hatóságokra, valamint a tudományos élet résztvevőire. Az elmúlt években az élelmiszer-előállítás globalizálódása, a higiéniai szabályok be nem tartása, a nem megfelelő hőkezelés vagy hűtés, illetve egyéb technológiai és más tényezőre visszavezethető okokból kifolyólag az élelmiszer eredetű megbetegedések gyakorisága növekvő tendenciát mutat. Ennek háttérében az esetek jelentős részében mikrobiológiai szennyeződés áll.

Az élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős kórokozó baktériumok közül a *Campylobacter* fajok által okozott megbetegedések száma igen jelentős. Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal 2007-es jelentése szerint az Európai Unió tagállamaiban 200 507 kampilobakteriózisos megbetegedést regisztráltak, amely valamivel magasabb a szalmonellák által okozott megbetegedéseknél (151955 regisztrált eset; EFSA, 2009). Magyarországon a termofil *Campylobacter* fajok által okozott fertőzések aránya jóval magasabb az Európai Unió átlagánál, azonban a bejelentett esetek száma az utóbbi időben csökkenő tendenciát mutat (Szeitzné, 2008). A humán kampilobakteriózisos több mint 95 %-át *C. jejuni* törzsek okozzák (Miller and Mandrell 2006), míg a többi esetért elsősorban a *C. coli* fajba tartozó törzsek a felelősek. A *Campylobacter* fajok egyértelmű azonosítása azonban bonyolult, mivel ezen patogének lassan növvő, igényes szervezetek. Elkülönítésükre korábban csak fenotípus alapú módszereket alkalmaztak, és így az azonosítás csupán néhány morfológiai és fiziológiai kritérium alapján volt lehetséges (Cardarelli-Leite et al., 1996; Gorkiewicz et al., 2003). A fenotípus alapú identifikálás azonban gyakran téves eredményekhez vezethet (Steinhauserova et al., 2001), emiatt megnőtt az igény az olyan, elsősorban DNS alapú módszerek kidolgozása és alkalmazása iránt, amelyek segítségével a humánpatogén *Campylobacter* fajok kimutatása, azonosítása, tipizálása, valamint terjedési útvonaluk feltérképezése gyorsan és hatékonyan megvalósítható.

Humán egészségügyi szempontból szintén jelentős baktériumok az *Escherichia coli* faj Shiga-toxin termelő (STEC) törzsei, amelyek számos virulencia faktoruk által, továbbá toxin termelésük révén súlyos megbetegedéseket okozhatnak. A STEC csoporton belül az enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC) törzsek kimutatása alacsony infekciós dózisuk, valamint az általuk előidézett vérzéses bélgyulladás, vesegyulladás, illetve vérzéses húgyúti fertőzés (Schmidt és Karch, 1996) miatt

kiemelt jelentőséggel bír. Az elmúlt években számos olyan PCR-alapú diagnosztikai módszert dolgoztak ki, amelyek célszekvenciái különböző virulencia gének voltak, mint például a Shiga toxin, az intimin, vagy akár az enterohemolizin gének (Meng et al., 1998). Az *Escherichia coli* faj törzseinek azonban élelmiszer-biztonsági vonatkozásain kívül élelmiszer-higiéniai szempontból is nagy a jelentőségük, mivel élelmiszerek esetén a friss, fekáliás szennyezettség indikátorai, így az *E. coli* faj, illetve a faj patogén törzseinek élelmiszerekből történő kimutatása nagyon jelentős.

A kórokozó mikroorganizmusok kimutatása és vizsgálata hagyományos módszerekkel hosszú múltra tekint vissza, azonban ezen eljárások idő- és munkaigényesek, így számos olyan új eljárást fejlesztettek ki az elmúlt évtizedekben, amelyek alkalmazása a rutinszerű vizsgálatok során is széles körben alkalmazható. A gyors vizsgálati módszerek közül a nukleinsav alapú molekuláris biológiai technikák egyre szélesebb körben, egyre nagyobb teret hódítanak. A polimeráz láncreakción alapuló eljárások mára már nemcsak a kutató laboratóriumok nélkülözhetetlen és mindennaposan alkalmazott eljárásai közé tartoznak, de az élelmiszerek vizsgálatával foglalkozó mikrobiológiai laboratóriumok körében is egyre nagyobb népszerűsége tesznek szert. Az élelmiszerekben előforduló patogén mikroorganizmusok azonosítására és törzs szintű jellemzésére (tipizálására) kidolgozott nukleinsav alapú molekuláris biológiai módszerek alkalmazása jelentősen hozzájárul ezen mikrobák eredetének és terjedési útvonalának feltérképezéséhez.

Munkám során célul tűztem ki élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok (*Escherichia coli* és termofil *Campylobacter* törzsek) kimutatását, azonosítását és jellemzését, ezáltal hozzájárulva a kórokozók élelmiszerekből történő gyorsabb detektálásához, diverzitásának és epidemiológiájának pontosabb meghatározásához.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az élelmiszer-biztonság és jogszabályi háttere

Az emberiség történetének kezdete óta léteznek problémák az élelmiszerekkel, amelyeket nap mint nap elfogyasztunk. Az élelmiszer-biztonság története azonban csak rövidebb múltra tekint vissza, ezzel kapcsolatos ismereteink megszerzése pedig az 1600-as évek elején kezdődött a tudományos felfedezésekre alapozva (Thrall, 2008). A mikrobiológia, és ezen belül az élelmiszer-mikrobiológia kialakulása adott lehetőséget a mikrobák pontos meghatározására, a gyors diagnosztika kifejlesztésére és az élelmiszerek mikrobiológiai minősítésére (Rodler, 2006).

Napjainkban a nyersanyag-feldolgozás, az élelmiszer-előállítás és -forgalmazás során legfontosabb szempont a megfelelő minőségű és egyben biztonságos élelmiszerek előállítása a fogyasztó egészségének védelme érdekében. Ennek megvalósításához azonban nélkülözhetetlen a mikrobiológiai kockázat csökkentése és kiküszöbölése. A nyers, valamint a természetes biológiai eljárásokkal készített élelmiszerekben előforduló kórokozó, illetve romlást okozó mikroorganizmusok kimutatására, jellemzésére, azonosítására nagy hangsúlyt fektetnek a megfelelő minőségű és biztonságos élelmiszerek iránt tapasztalható növekvő igények miatt (Blackburn, 2003; Deák, 2006a). Az élelmiszer-biztonság tehát annak biztosítása a termelés, az élelmiszer-előállítás, a tárolás és a forgalomba hozatal teljes folyamatában, hogy az élelmiszer nem veszélyezteti a végső fogyasztó egészségét, ha azt a rendeltetési célnak megfelelően készíti el és fogyasztja (2003. évi LXXXII. törvény).

Az élelmiszerek biztonságos fogyaszthatósága érdekében megfelelő szabályok és követelmények megalkotása vált szükségessé. Az Európai Parlament és a Tanács 178/2002/EK rendelete az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal létrehozásáról, és az élelmiszer-biztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról szól. A nemzeti jogszabályok közül az élelmiszerekről szóló hatályos törvény a 2003. évi LXXXII. törvény, amelynek egyes rendelkezéseit módosította a 2005. évi CLIX. törvény. Az élelmiszerlánc szabályozásában megalkotott 2008. évi XLVI. törvény célja a végső fogyasztók egészségének, érdekeinek védelme; az állatok egészségének megóvása, a növények védelme; az élelmiszer-előállítás és értékesítés elősegítése; az élelmiszer- és takarmányvállalkozók érdekeinek védelme; valamint a kockázati tényezők csökkentése és a nemzetközi kereskedelem biztosítása.

Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumait foglalja össze a Bizottság 2073/2005/EK rendelete. A rendelet mikrobiológiai kritériumokat állít fel egyes mikroorganizmusokra és meghatározza azokat a végrehajtási szabályokat, amelyeket az általános és konkrét higiéniai intézkedések végrehajtásakor követni kell. A rendelet egyaránt definiálja az élelmiszer-biztonsági kritériumokat (az adott termék/tétel mikrobiológiai elfogadhatóságát, amely követelményt az eltarthatóság teljes ideje alatt teljesíteni kell) és a technológiai-higiéniai kritériumokat (amelyek az adott gyártási technológia működésének megítélésére szolgálnak, és amelyeknek a gyártási folyamat meghatározott szakaszában kell teljesíteniük).

2.2. Az élelmiszer-biztonságot befolyásoló tényezők

Az élelmiszer-biztonságot különböző veszélytényezők befolyásolják, amelyek közül a négy legfontosabb a következő: (1) biológiai tényezők – patogén mikroorganizmusok jelenléte és szaporodása, (2) kémiai tényezők – toxikus komponensek jelenléte, (3) fizikai tényezők – idegen anyagok előfordulása, valamint (4) az elemi csapások következményei (Knura et al., 2006). A patogén mikroorganizmusok között kell megemlíteni az élelmiszer-fertőzést vagy élelmiszer-mérgezést okozó baktériumokat, a mikotoxin termelő fonalgombákat, valamint az élelmiszer eredetű parazitákat (Mogensen and Holm, 2003; Knura et al., 2006). Az utóbbi időben azonban egyre gyakrabban mutatnak ki vírusok által okozott megbetegedéseket, amelyek következtében jelenleg a norovírusok és a hepatitis A vírus tekinthetők a legjelentősebb élelmiszer eredetű humán patogén mikroorganizmusoknak (Koopmans és Duizer, 2004). A toxikus anyagok a nyersanyagokban természetes összetevőkként is megtalálhatóak, azonban a tárolás és a feldolgozás során is keletkezhetnek mérgező vegyületek. További forrásként szolgálhatnak a környezetből származó szennyeződések, a növényvédőszer maradványok, az állatgyógyászatban használt vegyületek (antibiotikumok és hormonok), valamint a fertőtlenítőszeres (Biró, 2000; Knura et al., 2006). Idegen anyagoknak tekinthetők az üveg-, a fém-, a fa- és a kődarabok. Az elemi csapások közé sorolhatunk minden más olyan jelenséget, amelyek negatívan befolyásolják az élelmiszerek biztonságát, így például egy atomerőműben bekövetkező katasztrófa élelmiszerekre kifejtett hatását (Knura et al., 2006).

2.3. Állati eredetű élelmiszerek élelmiszer-biztonsági vonatkozásai

Az élelmiszeripari termékek fajtái, típusai és választéka rendkívül nagy. A termékek főbb csoportjait a meghatározó állati vagy növényi eredetű összetevő, a gyártási vagy a felhasználási mód szerint lehet meghatározni (Deák, 2006a). Az élelmiszereket általánosságban biztonságosnak

tekintjük, feltételezván, hogy megfelelő gondossággal állították elő, készítették el, tárolták és kezelték (Constable et al., 2007). Az élelmiszerek alapanyagául szolgáló állatok egészségi állapota többféleképpen befolyásolhatja a patogénnel való fertőződést. A beteg, vagy tünetmentes fertőzött állattal való közvetlen kontaktus, az állat gondozása, hújának illetve termékeinek feldolgozása jelentősen hozzájárul a kórokozók terjedéséhez, továbbá a feldolgozás során a patogénnel szennyezett állati részek eltávolítása megnöveli a mikrobiológiai szennyeződés és keresztszennyeződés esélyét (Singer et al., 2007; Szeitzné, 2008).

A mikrobiológiai élelmiszer-biztonság szempontjából a veszélyforrások közül elsősorban azokat kell figyelembe venni a technológiai folyamatok során, amelyek élelmiszer-mérgezést, vagy – fertőzést okoznak. Az állati eredetű élelmiszerek esetében a nyersanyagként szolgáló vágóállatok az elsődleges mikrobiológiai veszélyforrások, így a vágási technológiában a higiéniai feltételek megvalósítása nélkülözhetetlen, míg a termékgyártás folyamatában alapvető jelentőségű az előírt hőmérsékleti értékek biztosítása (Biró, 2000). Az eltarthatóság növelése és a megfelelő biztonság kialakítása érdekében a húsok tartósítása során leggyakrabban a hűtést és fagyasztást, a hőkezelést (beleértve a konzerválást), az érlelést és szárítást alkalmazzák, azonban a megfelelő cél elérése érdekében ezeket a kezeléseket gyakran kombinálva használják (Roberts et al., 1998).

A feltételesen patogén mikrobákkal szennyezett állati eredetű élelmiszerek elfogyasztása sok ember megbetegedését okozhatja, így a vöröshúsokban, a baromfihúsban és a tojást tartalmazó termékekben ezen mikroorganizmusok jelenlétének vizsgálata lényeges az élelmiszerek biztonságos fogyaszthatóságának érdekében. Hagyományos és modern mikrobiológiai módszerek egyaránt rendelkezésre állnak a patogének kimutatására és sejtkoncentrációjuk meghatározására, azonban a tenyésztésen alapuló eljárások időigényesek, az eredmények csak napok múlva értékelhetők, így egyre nagyobb az igény a gyors kimutatási módszerek iránt (Fung, 1991; Fung, 2002; de Boer, 2007).

2.3.1. Nyers húsok mikrobiológiai biztonsági kérdései

Az egészséges vágóállatok izomszöveteiről feltételezzük, hogy a levágás időpontjában mikrobáktól mentesek. Ha azonban a kereskedelmi forgalomban lévő húsokat vizsgáljuk, számos mikroorganizmus mutatható ki. A szennyeződés különböző forrásokból kerülhet a termékekre, így például a szeletelő késről, az állat bőréről, az emésztőtraktusból, a dolgozók kezéről, a tárolókról és a környezetből (Jay et al., 2005). A vörös húsok és a baromfihús mikrobiótája általában hasonló, az előforduló különbségek az eltérő vágási és feldolgozási technológiákból adódnak (Corry, 2007). A

húsok mikrobiótája tükrözi a vágóhídon és a feldolgozó üzemben található mikrobaközösségeket, amelyekben elsősorban a Gram-negatív baktériumok (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacteriaceae*) dominálnak. A Gram-pozitívok közül az enterokokkusok és a laktobacillusok fordulnak elő leggyakrabban, azonban megtalálhatók még a *Micrococcus* nemzetség fajai, korineform baktériumok, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Streptococcus*, *Bacillus* nemzetség fajai és a *Brochothrix thermosphacta* is.

Mivel a penészgombák szinte mindenütt megtalálhatók a környezetben, így különböző fajai viszonylag nagy számban fordulnak elő a húsfeldolgozás környezetében is (Jay et al., 2005; Corry, 2007). A friss vöröshúsokon leggyakrabban előforduló fonalgombák közé a *Thamnidium*, a *Mucor*, a *Rhizopus* fajokat soroljuk, amelyek fehér micéliumokat hoznak létre a marhahúson, a *Cladosporium* fajokat, amelyek a fekete foltok kialakulásáért felelősek, a zöld telepeket képző *Penicillium* fajokat, valamint a *Sporotrichum* fajokat, amely fehér foltok megjelenését okozzák (Kotula és Kotula, 2000). Az élesztők közül a *Candida* és a *Rhodotorula* nemzetség fajai a dominánsak. Baromfihúsokon gyakran fordulnak elő *Yarrowia lipolytica* és *Candida zeylanoides* fajhoz tartozó törzsek (Deák, 2001), míg Nielsen és munkatársai (2008) *Candida zeylanoides*, *Candida galli* és egy nemrégiben leírt faj, a *Candida alimentaria* dominanciáját mutatták ki friss húsok esetében. A húsfeldolgozás szempontjából néhány esetben előnyös az élesztők növekedése. Egyes fajok, mint például a *Debaryomyces hansenii* és a *Candida utilis* pozitívan befolyásolja az aroma kialakulását, a fermentált kolbászokban pedig hozzájárulnak a vörös szín stabilizálásához, azonban az esetek nagy részében az élesztők jelenléte a húsokon és húskészítményekben nem kívánatos. Számos esetben csomagolt húsok puffadását, nyálkaképzést, kolbászok elszíneződését, és kellemetlen ízanyagok keletkezését idézik elő. Élelmiszer-biztonsági szempontból gondot okoz, hogy egyes élesztők metabolizálják a szerves savakat és a nátrium-nitritet, amely utóbbi egyrészt tartósítószerként szolgál, másrészt stabilizálja a vér hemoglobinját (Nielsen et al., 2008).

A haszonállatok számos, az emberre potenciálisan veszélyt jelentő mikroorganizmust hordozhatnak. Ebből a szempontból legjelentősebbek a zoonózist okozó baktériumok, így a *Salmonella* és a *Campylobacter* fajok, az *Escherichia coli* patogén szerotípusai, mint például az O157:H7 (Humphrey és Jørgensen, 2006), de a patogének között előfordulnak *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* és *Bacillus cereus* fajok is. A romlást okozó és feltételesen patogén baktériumok mellett nyers húsok esetében a parazitákat is meg kell említeni. A *Trichinella spiralis* terjedésének megakadályozása érdekében fontos az állat vágás előtti, valamint posztmortem vizsgálata, továbbá a hús fagyasztása vagy hőkezelése. Az endoparaziták közül a *Toxoplasma gondii* sertés-, birka- és egyéb húsokban

fordulhat elő, amely az emberi szervezetbe jutva súlyos megbetegedéseket is okozhat (Kotula és Kotula, 2000). A galandférgesek (*Taenia saginata* és *Taenia solium*) lárvái a nyersen vagy nem megfelelően hőkezelt sertés, vaddisznó és szarvasmarha hús elfogyasztásával kerülnek a szervezetbe, és a bélben kifejlődő férgek gyomor-bélpanaszokat, illetve neurológiai tüneteket okoznak (Doyle, 2003).

A vágást követően a mikrobák tevékenysége révén a húsok romlása gyorsan megindul. A vöröshúsok romlási folyamataiban aerob körülmények között elsősorban a *Pseudomonas* fajok dominálnak. Más mikrobák, mint az *Acinetobacter* és a *Psychrobacter* nemzetség fajai csak viszonylag alacsony számban fordulnak elő (Corry, 2007). A húson előforduló pszeudomonaszok a glükózt metabolizálják, ha azonban a diffúzió következtében a belső szövetekből már nem kerül megfelelő mennyiségű szénhidrát a hús felszínére, aminosavak és fehérjék lebontása révén ammónia, különböző aminok és szulfidok keletkeznek, amelynek következtében jellegzetes, kellemetlen szaganyagok képződnek (Koutsoumanis et al., 2008). Vákuumban vagy módosított légterben az aerob romlást okozó mikrobák háttérbe szorúlnak. Ilyen körülmények között a *Brochothrix thermosphacta* és a tejsavbaktériumok vannak túlsúlyban (Jackson et al., 1997), azonban *Yersinia enterocolitica* nem patogén szerotípusainak előfordulásáról is beszámoltak már (Corry, 2007). A tejsavbaktériumok és a *Brochothrix* glükóz metabolizmusa révén szerves savak keletkeznek, amelynek következtében a romlott hús savanykás, gyakran sajtra emlékeztető szaggal jellemezhető (Koutsoumanis et al., 2008). Baromfihús hűtőtárolása során a gyorsan szaporodó mikrobák, mint a pigmentált és nem-pigmentált *Pseudomonas* fajok (*P. fluorescens*, *P. fragi* és *P. putida*) anyagcsere tevékenysége révén indul meg a romlási folyamat. A pszeudomonaszok mellett alacsony számban *Acinetobacter* fajok és a *Psychrobacter immobilis* is részt vesz a romlásban (Mead, 2000). A pszichrofil patogének (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* és *Aeromonas* fajok) mellett a baromfihús által közvetített kórokozók a termofil *Campylobacter* és a *Salmonella* fajok. Ezen patogén baktériumok terjedésének és az élelmiszerekbe kerülésének megismerése lényeges az ellenük való védekezés szempontjából.

2.3.2. Tejtermékek mikrobiológiai biztonsági kérdései

A tápanyagokban, különösen fehérjékben és lipidekben gazdag tej kitűnő tápközeg sok mikroorganizmus számára, mivel nagy vízaktivitása, semleges pH-ja és gazdag tápanyagtartalma kedvező a szaporodásukhoz. A nyers tej szennyező forrásaként tartjuk számon a környezetet (levegő, víz, ember), a tároló edényeket, de a tejelő állatokat is. Az egészséges tehenek tőgyébe kiválasztódó tej mikroorganizmusoktól mentes, azonban az állatok az ember egészségére káros

szervezeteket is hordozhatnak, így nem meglepő, hogy a nyers tej fogyasztása megbetegedésekhez vezethet. A patogén baktériumok közül többek között *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 által okozott megbetegedéseket jegyezték fel korábban, továbbá a szarvasmarhákban és egyéb kérődzőkben megbetegedést kiváltó *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* tejjel közvetítve az emberben szintén megbetegedést okozhat (Grant et al., 1996; Griffith, 2000; Jay et al., 2005). Lévén a tej a laktóz egyetlen természetes forrása, romlását a laktóz hasznosító szervezetek tejsavtermelése által bekövetkezett kazein precipitációja okozza. A tej azonban nem teljesen védtelen a mikrobákkal szemben, mivel számos természetes antimikrobás anyagot (laktoperoxidázt, laktoferrint, lizozimet és specifikus immunglobulinokat) tartalmaz (Deák, 2006a).

A tejből különböző technológiai eljárásokkal számos terméket állítanak elő. A fermentált tejtermékek közül a tej vagy tejszín tejsavbaktériumokkal való beoltásával készül a vaj, a joghurt, a tejföl és a sajtok, de spontán fermentáció is előfordul. Ezen termékek patogén baktériumokkal való szennyeződésére és az elfogyasztásuk általuk okozott megbetegedésekre számos példa található a szakirodalomban.

2.4. Élelmiszer-biztonsági szempontból fontos patogén baktériumok

Az élelmiszer eredetű patogén baktériumok közül legfontosabbak a *Salmonella* fajok, a *Campylobacter jejuni* és a *Campylobacter coli*, az *Escherichia coli* patogén változatai (például az O157:H7 szerotípus), a *Yersinia enterocolitica*, a *Shigella*, a *Vibrio*, az *Aeromonas* és *Plesiomonas* fajok, a *Clostridium botulinum* és *Cl. perfringens*, továbbá a *Bacillus cereus*, a *Listeria monocytogenes* és a *Staphylococcus aureus* (Doyle et al., 1997; Baird-Parker, 2000; Uyttendaele és Debevere, 2003).

A patogének elsősorban különböző élelmiszerek közvetítése által jutnak az ember szervezetébe, azonban háziállatok és az emberek is terjeszthetik a kórokozókat. Az *Escherichia coli* O157:H7 szerotípusra visszavezethető, élelmiszer eredetű megbetegedések során a fertőzések forrásaként spenót (Grant et al., 2008), nyers tej (Denny et al., 2008), marhahús (Strachan et al., 2006), fagyasztott marhapástétom (Delignette-Muller et al., 2008) és pepperónis pizza (<http://www.cdc.gov/index.htm>) is feljegyzésre került. A *Listeria monocytogenes* által okozott megbetegedések leggyakrabban nyers tej vagy ebből készített sajt fogyasztásával hozhatók összefüggésbe (Rossi et al., 2008), a *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) egyik jelentésében azonban olvasható, hogy az elmúlt évben *L. monocytogenes*-szel fertőzött pasztőrözött

tej fogyasztása okozta néhány ember megbetegedését (Anonymus, 2008). Liszteriózisos megbetegedések azonban más élelmiszerekre is visszavezethetők voltak, így például hot dogra, felvágottakra és pástétomra is (Rossi et al., 2008). Egyre nagyobb számban okoznak megbetegedést a termofil kampilobakterek. Ezen patogének elsődleges forrásai a baromfik (Keener et al., 2004), azonban kutya és macska ürülékéből is kimutatták már jelenlétüket (Workman et al, 2005), így a háziállatokat is a rezervoárok között kell megemlíteni. Számos kampilobakteriózis fordult elő víz, nyers tej, illetve csirkehús fogyasztásával kapcsolatban (Evans et al., 1996; Jiménez et al., 2005; Black et al., 2006), míg az elmúlt évben az Anchorage Daily News (2008) több ember megbetegedéséről számolt be hőkezelés nélkül elfogyasztott, kampilobakterrel szennyezett borsó következtében.

A következőkben a fent említett patogének közül az értekezésem szempontjából lényegeseket ismertetem részletesebben.

2.4.1. Az *Escherichia coli* faj patogén változatai

Az *Escherichia coli* törzsek az ember és a melegvérű állatok béltraktusában található normális fakultatív anaerob mikrobióta gyakori tagjai. Gram-negatív, oxidáz-negatív szervezetek, amelyek többnyire peritrich flagellumok segítségével mozognak. Optimális szaporodási hőmérsékletük 37 °C, azonban széles hőmérsékleti intervallumon belül (15-45 °C) képesek szaporodni. pH optimumuk 6-7 közötti, azonban 4,4 és 9-10-es pH értékek között is tapasztalható szaporodás. A legkisebb pH érték, amelyen még szaporodás mutatkozik, függ a közegben jelenlévő savtól: azonos pH értéken a szervetlen savak (például a sósav) a szerves savakhoz képest (ecetsav, tejsav) kevésbé gátolják a szaporodást. Az *E. coli* sejtek mind aerob, mind pedig anaerob körülmények között szaporodnak (Willshaw et al., 2000; Anonymus, 2001). Három felületi antigénjük (O-szomatikus, H-csilló, K-tok) alapján az izolátumok szerológiaiilag elkülöníthetők egymástól. A legtöbb *E. coli* törzs ártalmatlan kommenzalista szervezet, azonban léteznek patogén törzsei is, amelyek esetenként súlyos megbetegedéseket okoznak (Doyle et al., 1997). Néhány *E. coli* törzs ugyanis mobilis genetikai elemeken (plazmidok, transzpozonok, bakteriofágok) és patogenitási szigeteken keresztül specifikus virulencia faktorokhoz jutott, és patogénné vált (Yoon és Hovde, 2008). A hasmenéses megbetegedések kialakulásában való szerepükre az elmúlt 25 évben terelődött a figyelem. A hasmenést okozó izolátumok alapos összehasonlítása révén a következő négy csoportját különítették el a patogén *E. coli* törzseknek: enteropatogén (EPEC), enterotoxikus (ETEC), enteroinvazív (EIEC) és Vero-citotoxin termelő (VTEC) törzsek. Az utóbbi csoport jellemzésére egyéb szakkifejezések alkalmazása is gyakori, így a Shiga-szerű toxint termelő *E. coli* (SLTEC),

míg a legutóbbi időkben a Shiga toxin-termelő *E. coli* (STEC) elnevezés terjedt el. Az enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC) kifejezés azon törzsek esetében került bevezetésre, amelyek véres hasmenést okoznak, ezek azonban valójában a STEC csoport tagjai közé sorolhatók. Az *E. coli* törzseket tulajdonságaik és a kiváltott tünetek alapján további két csoportba sorolták, kialakítva az enteroaggregatív (EAggEC) és a diffúzan kapcsolódó (DAEC) törzsek csoportját. A fent említett csoportokba a törzsek O és H antigénjeik, valamint specifikus virulencia markereik alapján kerülnek besorolásra, azonban az általuk kiváltott klinikai tünetek, epidemiológiájuk és földrajzi elterjedésük alapján még további kategóriákba is besorolhatók (Willshaw et al., 2000). Így legalább hat olyan jól jellemzett csoport vagy patotípus létezik az *E. coli* fajon belül, amelyek bélrendszeri megbetegedést okozhatnak. Elkülöníthetők azonban olyan patogén törzsek is, amelyek bélrendszeren kívüli fertőzéseket okoznak. Az uropatogén *E. coli* (UPEC) törzsek a közösségekben szerzett (community-acquired) húgyúti fertőzések legfőbb okozói. A meningitisszel/szepszissel összefüggő *E. coli* (NMEC) az újszülöttek agyhártyagyulladásáért leggyakrabban felelős patotípus. Néhány *E. coli*-ra jellemző, hogy nemcsak emberekben, hanem állatokban is megbetegedéseket okoznak. Nekrotoxikus *E. coli* (NTEC), valamint a Crohn-betegséget okozó tapadó-behatoló (adherent-invasive) *E. coli* (AIEC) törzseket mind emberi, mind pedig állati fertőzések esetében kimutattak már. Léteznek azonban olyan törzsek is, amelyeket ezidáig csak állati megbetegedésekből izoláltak, ilyen például a madár patogén *E. coli* (APEC) (Kaper, 2005).

Az itt felsorolt számos csoport közül élelmiszer-biztonsági szempontból a Shiga toxin-termelő *Escherichia coli* (STEC) törzsek a legjelentősebbek. Az által okozott megbetegedéseknél a bejelentett esetek közel feléért az O157:H7 szerotípusú törzsek felelősek (Delignette-Muller et al., 2008). Ezen baktériumok a bélhámsejtekhez való kapcsolódásuk, majd ezt követő Shiga-toxin (Stx1 és/vagy Stx2) termelésük révén okoznak fertőzést (Miranda et al., 2004). Az általuk okozott megbetegedések, mint például a hemorrágiás kolitisz (vézses vastagbélgyulladás), vagy a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) (Teel et al., 2007) igen súlyos tünetekkel járnak. A több mint 400 STEC szerotípus közül, leszámítva a már említett O157:H7 és O157:H⁻ (nem mozgó) törzseket, az O26, az O103, az O111 és az O145 szerotípusok izolálhatók leggyakrabban emberi forrásból (Scheutz és Strockbine, 2005). Valamennyi enterohemorrágiás *Escherichia coli* (EHEC) és STEC rendelkezik Shiga-toxin génekkel (*stx*), amelyek által kódolt toxinok az eukarióta 28S rRNS-ben az adenin depurinálása révén megakadályozzák az elongációs faktor 1 (EF1)-függő aminoacil tRNS kötődését a 60S riboszómális alegységhez, gátolva ezáltal a fehérjeszintézist (Gallien, 2002; Scheutz és Strockbine, 2005). Az EHEC törzsek esetében azonban még mindig nem tisztázott, hogy mely tényezők és/vagy mechanizmusok alapján különíthetők el a STEC törzsektől.

Az *E. coli* faj szintű és a patogén változatainak detektálására számos eljárás alkalmazható. A patogén *E. coli* törzsek kimutatása során a hagyományos és a molekuláris módszereket együttesen alkalmazzák. Az izoláláshoz és azonosításhoz klasszikus, fenotípus vizsgálaton alapuló módszereket, míg a patogenitási faktorok detektálásához immunológiai és molekuláris biológiai eljárásokat használnak (Uyttendaele és Debevere, 2003). A világszerte sok megbetegedést okozó EHEC O157:H7 szerotípust tipikus fenotípusos tulajdonsága, a szorbitol fermentálás hiánya alapján diagnosztizálják legegyszerűbben (Gallien, 2002; Bielaszewska és Karch, 2000), azonban erre a célra számos más módszert is kifejlesztettek. Az EHEC törzsek kimutatására vonatkozó szabvány (EN ISO 16654:2001) a dúsítást követően az O157 antigén jelenlétének megerősítő vizsgálatán alapszik. A szabvány szerinti detektálás megközelítőleg négy napot vesz igénybe (Basselet et al., 2008), így a PCR-alapú kimutatási módszerek egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert. Az elmúlt években az *E. coli* faj patogén törzseinek detektálására számos PCR alapú molekuláris biológiai módszert fejlesztettek ki (Wang et al, 1997; Holland et al., 2000; Fu et al., 2005; Stefan et al., 2007). Az 1. táblázat néhány, elsősorban a STEC és EHEC törzsek kimutatására alkalmazható eljárást tartalmaz.

1. táblázat: Shiga toxin-termelő és enterohemorrágiás *Escherichia coli* törzsek, illetve virulencia faktoraik kimutatására alkalmazható immunológiai és molekuláris biológiai módszerek

Módszerek	Célmolekula/célgén	Referencia
Immunológiai módszerek		
Optikai immunvizsgálat	Shiga toxin (Stx1 és/vagy Stx2)	Teel et al., 2007
Latex agglutináció	Intimin	Hajra et al., 2007; Carrol et al., 2003
Immunmágneses szeparálás	O157 antigén	Karch et al., 1996; Bielaszewska et al., 2000a; Fu et al., 2005
PCR-alapú molekuláris módszerek		
Multiplex PCR	<i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>eaeA</i> , EHEC <i>hlyA</i> , <i>rfb</i>	Paton és Paton, 1998; Franck et al., 1998; Wang et al., 2002; Osek, 2003
Real-time PCR	<i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>eae</i> , E <i>hly</i> , O antigén gének, <i>SIL_{O157}</i> ,	Reischl et al., 2002; Perelle et al., 2004; Fu et al., 2005; Stefan et al., 2007
Multiplex real-time PCR	<i>stx₁</i> , <i>stx₂</i>	Jinneman et al., 2003
DNS chippek	Különböző virulencia gének	Call et al., 2001; Chizikov et al., 2001; Basselet et al., 2008

A specifikus gének kimutatásával következtetni lehet a faj, illetve az egyes szerotípusok jelenlétére vagy hiányára. Az *E. coli* fajba tartozó törzsek kimutatása során az egyik lehetséges célszekvencia a *malB* gén, amely a maltóz reguláció egy jellemző génje. A *malB* régió két, ellentétesen és eltérő módon átíródó operonból, a *malJ* (*lamB*) és *malK* operonokból áll, amelyek a maltóz és a

maltodextrinek transzportjában vesznek részt. Bármely operonban bekövetkező mutáció a maltóz-permeáz aktivitás elvesztését okozza (Hofnung et al., 1974; Raibaud et al., 1979). A faj O157:H7 szerotípusú törzseinek detektálásához alkalmazható egyik célszekvencia az enterohemolizint kódoló (*hlyA*) génszakasz. Az enterohemolizin egy nagyméretű, körülbelül 93 kbp. nagyságú virulencia plazmidon kódolt fehérje, amely kódoló DNS szekvenciája hasonlít a kromoszómán kódolt *E. coli* α -hemolizin szekvenciához. Az emlősök eritrocitáit lizáló törzsek enterohemolizin operonja négy génből (*hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, és *hlyD*) áll, amelyek a toxin szintéziséhez és szekréciójához egyaránt szükségesek. Az enterohemolizin jelenlétét azonban nemcsak O157:H7 szerotípusú törzsek esetében mutatták ki, hanem egyéb, például O26 és O111 szerotípusú törzseknél is detektálták már (Schmidt et al., 1995; Makino et al., 1998).

2.4.2. *Campylobacter* fajok

Már az 1880-as évek legelején leírták székletben előforduló, spirális alakú baktériumok jelenlétét (Frost, 2001). Ezt követően 1913-ban McFadyean és Stockman feljegyezte a *Vibrio fetus* elnevezésű baktérium tiszta tenyészetben történt izolálását, amelyet juhok és szarvasmarhák vetélésével hoztak összefüggésbe (Foster, 2004). Később, 1963-ban M. Sebald és M. Véron javasolta először egy új nemzetség létrehozását néhány, korábban a *Vibrio* nemzetségbe sorolt baktérium fajból. Az így kialakított *Campylobacter* nemzetség kezdetben csupán a *C. fetus* és a ma *Campylobacter sputorum* néven ismert *C. bubulus* fajokat tartalmazta (On, 2001). A kampilobakterek humán enterális megbetegedést okozó szerepét azonban csak a hetvenes években ismerték fel a szelektív tápközegek és a megfelelő izolálási eljárások kifejlesztését követően (Frost, 2001). A nyolcvanas évektől kezdve a bejelentett enterális megbetegedések leggyakoribb okai a kampilobakterek lettek. Az elmúlt évtizedekben a nemzetség számos új fajt írtak le, legutoljára a tengeri emlősökből izolált *Campylobacter insulaenigrae* fajt (Foster, 2004). Jelenleg a *Campylobacter* nemzetséget 17 faj, hat alfaj és 3 biovariáns (2. táblázat) alkotja (Korczak et al., 2006; Garrity et al., 2007).

A kampilobakterek Gram-negatív, nem spóráképző baktériumok. Sejtmorfológiájukra jellemző, hogy hajlított, S-alakú vagy spirális pálcák, amelyek idősebb tenyészetekben vagy hosszabb ideig levegőnek kitett állapotban gömbölyűvé, vagy kokkoid alakúvá válhatnak. A kampilobakterek a sejtek egyik vagy mindkét végén megtalálható flagellummal mozognak. A nemzetség egyes fajai mikraerofil természetűek, azonban előfordulnak aerob és anaerob fajok is (Nachamkin, 1997). Az ismert 17 *Campylobacter* fajból tizenkettő függ össze valamilyen emberi megbetegedéssel (Korczak et al., 2006). A nemzetség tagjai közül a *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, a *C. jejuni* subsp.

doylei, a *C. coli*, a *C. lari*, a *C. upsaliensis* és a *C. helveticus* alkot egy genetikailag összetartozó csoportot, amely fajok (a *C. jejuni* subsp. *doylei*-t leszámítva) a leggyakrabban izolált kampilobakterek mind emberi, mind pedig állati hasmenéses megbetegedések esetén (On, 2001).

2. táblázat: A *Campylobacter* nemzetség fajai és alfajai, hordozók és egyéb jellemzőik (Nachamkin, 1997; On, 2001; Korczak et al., 2006; Garrity et al., 2007 nyomán)

Faj/alfaj (biovariáns)	Hordozó	Egyéb jellemző
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	ember, más emlősök, madarak	termofil, mikroaerofil
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	ismeretlen	termofil, mikroaerofil
<i>C. coli</i> ^a	sertés, madarak	termofil, mikroaerofil
<i>C. upsaliensis</i>	háziállatok	termotoleráns faj
<i>C. helveticus</i> *	háziállatok	termofil faj
<i>C. lari</i>	madarak, kutyák	termofil, mikroaerofil, változékony faj ^b
<i>C. insulaenigrae</i> *	vízi emlősök (fóka, barna delfin)	legközelebbi genetikai rokonságot a <i>C. lari</i> fajjal mutatja
<i>C. concisus</i>	ember (szájüreg)	H ₂ -igényes, komplex faj
<i>C. showae</i>	ember (szájüreg)	H ₂ -igényes faj
<i>C. curvus</i>	ember (szájüreg)	H ₂ -igényes faj
<i>C. rectus</i>	ember (szájüreg)	H ₂ -igényes faj
<i>C. gracilis</i>	ember (szájüreg)	H ₂ -igényes faj
<i>C. hominis</i> *	ember (emésztőrendszer)	H ₂ -igényes faj, anaerob tenyésztés
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> ^c	ember, szarvasmarha, sertés	H ₂ -igényes faj (kataláz-neg, ureáz-neg)
<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>	ember	H ₂ -igényes faj (ureáz-pozitív)
<i>C. sputorum</i> biovar <i>faecalis</i> *	szarvasmarha, juh	H ₂ -igényes faj (kataláz-poz, ureáz-neg)
<i>C. mucosalis</i> *	sertés	DNS-DNS hibridizáció alapján a <i>C. sputorum</i> -hoz áll legközelebb
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	szarvasmarha, juh	szarvasmarhák és juhok vetélését okozza
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	szarvasmarha	fertőzések terméketlenségét okoz
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	szarvasmarha	jelentős diverzitás a 16S rRNS-ben
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	sertés	jelentős diverzitás a 16S rRNS-ben
<i>C. lanienae</i> *	ember (vágóhídi munkások)	közeli kapcsolat a <i>C. hyointestinalis</i> alfajokkal

^a a *Campylobacter hyoilei*-t a *C. coli* egyik patotípusaként sorolták be különböző fenotípusos és genotípusos jellemzői alapján; ^b a *C. lari* három fenotípusosan elkülönülő változata ismert: rezisztens biotípus, nalidixin-sav érzékeny változat és egy ureáz-pozitív változat; ^c a korábban *C. sputorum* biovar *bubulus* csoportba sorolt izolátumokat ma már a *C. sputorum* biovar *sputorum* csoportba sorolják. Az azonos színnel jelzett csoportok filogenetikailag közeli rokonságban állnak egymással. * nem tekinthetők állat- vagy emberpatogénnek.

2.4.2.1. A termofil *Campylobacter* fajok jellemzése

A fent említett csoport élelmiszer-biztonsági szempontból legkiemelkedőbb tagjai a bélhurutot okozó, termofil *Campylobacter jejuni* és *Campylobacter coli* fajokhoz tartozó törzsek. Mindkét fajról általánosságban elmondható, hogy mikroaerofilek (3-10 %-ban oxigént és 5-10 %-ban széndioxidot igényelnek a növekedésükhöz), oxidáz és kataláz pozitívak, valamint ureáz negatívak.

Jellemzőjük továbbá, hogy nem növekszenek 2 % NaCl jelenlétében, illetve 25 °C-on. A termofil kampilobakterek növekedési hőmérséklet tartománya 34-44 °C, optimális szaporodási hőmérsékletük 42 °C, amely utal a melegvérű madarak beleiben uralkodó magasabb hőmérsékletre való alkalmazkodásukra (Jay et al., 2005; Foster, 2004; van Vliet és Ketley, 2001). A *C. jejuni* szaporodását és túlélését számos környezeti tényező befolyásolja. Érzékenyen reagál a szárításra, a magasabb – 15-21 % körüli – oxigén koncentrációra, az alacsony pH-ra és a gamma-sugárzásra, ezért viszonylag rövid ideig marad életben a gazdaszervezeten kívül. A korai exponenciális fázisba lévő sejtek sokkal érzékenyebbek a környezeti tényezőkkel szemben, mint az exponenciális szakaszban növekvő, vagy a stacionárius fázisban lévő sejtek (Nachamkin, 1997).

A kampilobakterek által okozott megbetegedések elsősorban május és október között fordulnak elő, a leginkább érintett csoport a 10-29 éves korosztály. A szezonális a melegebb hónapokban tapasztalható nagyobb hőmérséklettel magyarázható, amely kedvez a kampilobaktereknek, míg a fiatalabb korosztály jelentősebb érintettségét egyes szerzők a székletminták ezen korosztály gyakoribb vizsgálatával magyarázzák (Anonymus, 2004). A legtöbb eset szórványosan fordul elő, azonban járványokról is vannak feljegyzések. Élelmiszerek közül leggyakrabban a nyers tej és a nem megfelelően elkészített szárnyas ételek okoznak megbetegedéseket. A fertőzést követően az érintettek a tünetmentességtől a súlyos megbetegedésig többféle tünetet mutathatnak. Jellemző a láz, az alhasi görcs és a hasmenés (Jay et al., 2005; Nachamkin, 1997). Súlyosabb esetben a perifériális idegrendszerre is kiterjedő, bénulással járó megbetegedést, az úgynevezett Guillain-Barré szindrómát okozzák (Nachamkin, 1998).

A termofil *Campylobacter* fajok (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) széles körben megtalálhatóak a környezetben, ahol elsősorban az állati eredetű széklettel történt friss szennyeződés indikátorai. Bár a haszonállatok, a háziállatok és a vadállatok beleiben gyakran fordulnak elő a különböző *Campylobacter* fajok, a környezet széklet eredetű baktériumokkal való szennyeződése időszakos, szezonálisan változik a stressz és a táplálkozásban történő módosulás függvényében (Jones, 2001). Kampilobakterek a vízvezetékben is előfordulhatnak mind planktonikus formában, mind pedig üledékhez tapadva vagy biofilmekben. Snelling és munkatársai (2005) *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a *C. jejuni* jelentősen hosszabb ideig (36 óráig) maradt életképes vízben előforduló protozoonok által bekebelezve, mint planktonikus formában. Vizsgálataikkal azt is alátámasztották, hogy a bekebelezett baktérium jóval ellenállóbb a fertőtlenítőszerekkel szemben, mint a planktonikus sejtek. Eredményeik azt sugallják, hogy a broilerek itatásához alkalmazott ivóvíz hálózatban megtalálható protozoonok késleltethetik a

kampilobakterek pusztulását és megnövelhetik rezisztenciájukat a fertőtlenítőszerrel szemben, ezáltal nőhet a csirkék *Campylobacter* fajokkal történő kolonizációjának lehetősége is.

A baktériumok, ezen belül a kampilobakterek környezetben, gazdaszervezet nélküli túlélésének egyik lehetséges módja a biofilm képzés. Különböző felületekhez (rozsdamentes acél és üveg) tapadva és kevert biofilmekben is képesek túlélni olyan körülmények között, amelyek egyébként gátolnák szaporodásukat. Dykes és munkatársai (2003) patogén *C. jejuni* törzs túlélését vizsgálták biofilmet alkotó és planktonikus formában. Eredményeik szerint a *C. jejuni* sejtek - ellentétben a legtöbb biofilmet is képző humánpatogén baktériummal - csökkent túlélést mutattak a biofilmekben. A sejtek hidrofóbicitása (amely összefüggésben van a humán bélhámsejtekhez való adhézis képességükkel) kisebb a biofilmekben, mint planktonikus formában, tehát a felületekhez kapcsolódó *C. jejuni* sejtek kevésbé virulensek, mint szabadon lévő párjaik. Azt is megfigyelték, hogy a biofilmeket alkotó sejtek sokkal érzékenyebbek a stresszhatásokkal szemben, mint a táplevesben szaporodó baktériumok. Joshua és munkatársai (2006) ezzel szemben kimutatták, hogy *C. jejuni* sejtek üveghez tapadva, vagy a gáz és folyadék határfelületen vékony hárttyát képezve, továbbá folyadékokban csomókat alkotva jobban ellenállnak a különböző környezeti stresszhatásokkal szemben, mint a planktonikus sejtek. Bár számuk az idő előrehaladtával lecsökkent az aggregált filmekben, mégis jóval hosszabb ideig maradtak életben, mint a biofilmet nem-képző sejtek.

A *C. jejuni* és a *C. coli* genomja viszonylag kicsi, mintegy 1,6-1,7 megabázispár nagyságú (van Vliet és Ketley, 2001). A *Campylobacter jejuni* teljes genomjának szekvenciáját Parkhill és munkatársai határozták meg először 2000-ben. A körülbelül 1,64 megabázis méretű cirkuláris kromoszóma 1654 fehérjét és 54 stabil RNS-féleséget kódol. A genom érdekessége, hogy gyakorlatilag nem tartalmaz inzerciós vagy fagra utaló szekvenciákat, és csupán nagyon kevés ismétlődő szekvenciával rendelkezik. A teljes genomban mindössze négy ismétlődő szekvencia található, amelyek közül a riboszóma RNS (rRNS) operon mindössze három kópiában fordul elő, míg a másik ismétlődő szekvencia három duplán vagy triplán ismétlődő, egyéb kódoló szekvencia. Meglepő azonban, hogy a genom számos hipervariábilis részletet tartalmaz, ahol három vagy több variáns van jelen közel azonos arányban. Ezek a rövid homopolimer nukleotid sorozatok a sejtfelszíni struktúrák bioszintézisében vagy módosításában részt vevő, vagy ismeretlen feladattal rendelkező génekben fordulnak elő. A homopolimer szekvenciák variációinak magas aránya fontos lehet a *C. jejuni* túlélési stratégiájában. A gyors szekvencia változások azt sugallják, hogy a *C. jejuni* nem rendelkezik fejlettebb DNS javító funkciókkal. A *C. jejuni* genomjának szekvencia-meghatározásával azonosították a hipervariábilis szekvenciákat, kimutatták a hagyományos operon

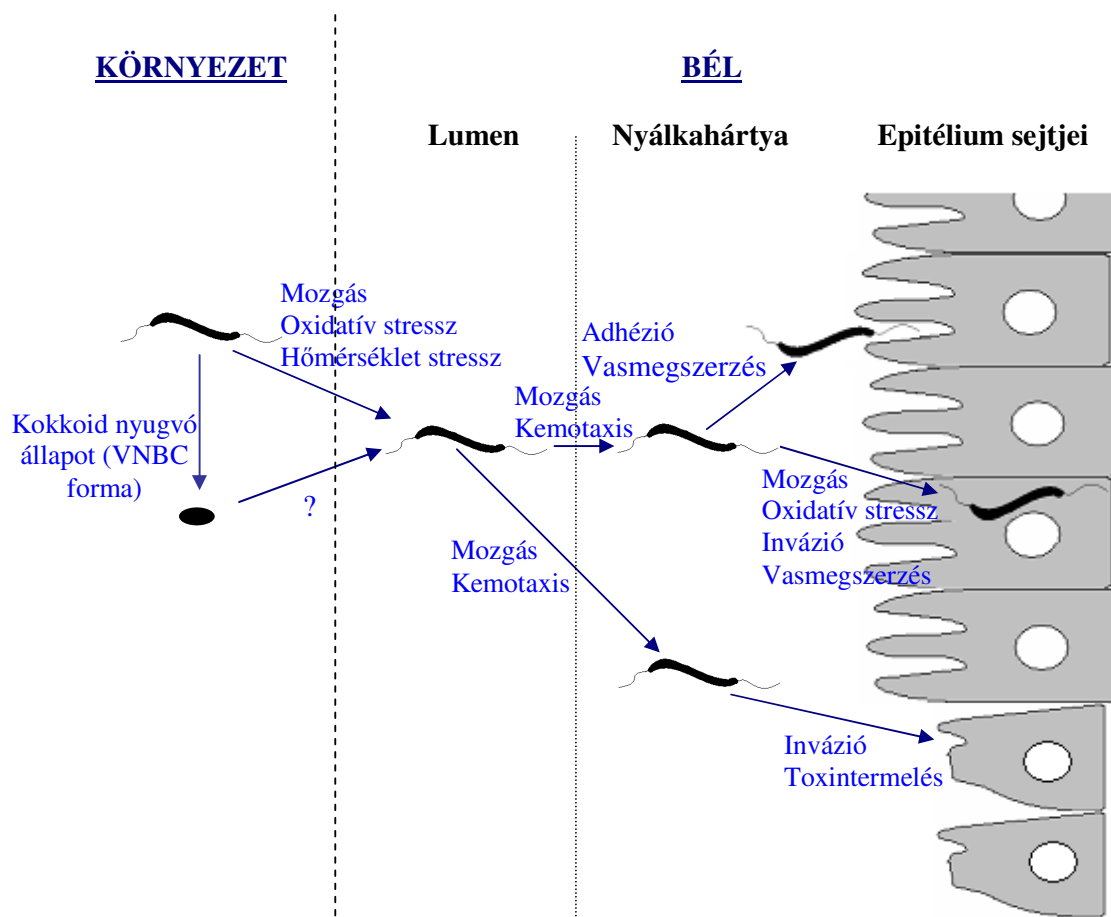
szerkezet és az ismétlődő DNS-ek hiányát, továbbá fény derült poliszacharid termelő képességére is (Parkhill, 2000). A Gundogdu és munkatársai (2007) által elvégzett genomszekvencia újra-annotálás és újraelemzés következtében lecsökkent a kódoló szekvenciák száma, illetve a gének új funkcióit tárták fel.

2.4.2.2. Patogenitás és virulencia

Az enterális kampilobakterek a bél kolonizációja során számos virulencia faktort expresszálnak. *Campylobacter* fajok esetén a mozgásképeséget (flagellum), a tapadást (adhézió), az inváziót, a toxintermelést, a sejtfelületi lipopoliszacharidokat, a kemotaxist, az oxidatív stressz elleni védekezést, az élő de nem tenyészthető (viable but not-culturable=VBNC) formát, valamint a vasionok megszerzését és a hősokra adott válaszokat tekintik virulencia tényezőknak (Walker et al., 1986; Wassenaar és Blaser, 1999; van Vliet és Ketlay, 2001; Bhavsar és Kapadnis, 2007). A kampilobakterek kolonizációjának fázisai, valamint az ahhoz szükséges feltételezett virulencia faktorok összefoglalása az *I. ábrán* látható.

A bél kolonizációjához szükséges a bélsejteket fedő nyálkahártyába való bejutás, így a **mozgás**, a poláris **flagellumok** révén nélkülözhetetlenek a *Campylobacter* fajok kolonizációjához (Morooka et al., 1985), amely a megbetegedés kialakulásának első lépése (Guerry, 1997). A flagellumok, valamint a jellegzetes 'dugóhúzó' alak segítségével a kampilobakterek hatékonyan jutnak át a bélsejtek nyálkarétegén (van Vliet és Ketlay, 2001). A kemotaxis, amely szintén fontos a megtelepedéshez, egy komplett szignál transzdukciós rendszer, amelynek segítségével a baktériumok érzékelni tudják a környezeti ingereket és erre válaszképpen a flagellum forgatásával felelnek (Bhavsar és Kapadnis, 2007).

A baktériumsejteknek a bélnyálkahártya felületéhez történő tapadása valószínűleg szintén meghatározó folyamat a kolonizáció során, továbbá előidézhetheti a kiválasztott bakteriális termékek lokális koncentrációjának növekedését is (Wassenaar, 1997). A patogenitási folyamatban a *C. jejuni* igen lényeges tulajdonsága a gazdasejthez való kötődése (**adhézió**), a belső szöveti sejtekbe történő bejutása (**invázió**), majd elszaporodása (**kolonizáció**). A mikroba a fertőzés során átjut a bélsejteket borító nyálkahártyán, hozzátapad a sejtekhez, majd megszállja azokat. Az epiteliális sejtek inváziója a nyálkahártya sérüléséhez és gyulladásához vezet, amely gyakran tapasztalható a kampilobakterek által okozott fertőzés során. Az adhéziót és az inváziót mind a mozgás, mind pedig a flagellinek expressziója befolyásolja. A flagellumok adhézióban betöltött szerepe mellett más adhezineknek is részt kell venniük a további internalizációban.



1. ábra: A *Campylobacter* fertőzés lépéseinek áttekintése a feltételezett virulencia faktorok feltüntetésével (van Vliet és Ketley, 2001 nyomán)

epitélium sejt *Campylobacter* kokkoid sejt

A patogén baktériumok adhéziójában gyakran fimbriákhoz hasonló struktúrák is részt vesznek (van Vliet és Ketlay, 2001). Doig (1996) munkatársaival együtt leírt egy olyan pilus-szerű struktúrát, amelynek megléte vagy esetleges hiánya befolyásolta a tapadást, és bizonyos esetében fontos volt a kolonizációs folyamatok során. Gaynor és munkatársai 2001-ben azonban kimutatták, hogy ezek az epesók hatására létrejövő pilus-szerű függelékek csupán a tápközeg hatására létrejövő, a baktériumtól függetlenül kialakuló műtermékek.

A kampilobakterek enteropatogenitásával kapcsolatos **toxinok**at elsődleges hatásmódjuk alapján két csoportba sorolhatjuk: az enterotoxinok és a citotoxinok csoportjába. Az enterotoxinok olyan kiválasztott fehérjemolekulák, amelyek hozzákapszolódnak a sejtek receptoraihoz, bejutnak a sejtbe és megemelik az intracelluláris cAMP szintet. A kampilobakterek által termelt citotoxinokat hat különböző csoportba sorolhatjuk: (a) 70 kDa citotoxin, (b) Vero/HeLa citotoxin, (c) felfúvódásos sejthalált okozó toxin (CDT), (d) Shiga-szerű toxin, (e) hemolitikus citotoxin és (f) hepatotoxin

(Wassenaar, 1997). Az említett toxinok és kódoló génjeik közül a felfúvódásos sejthalált okozó toxin (CDT) a legjobban tanulmányozott. Egyes kampilobakterek a CDT által kiváltott citotoxicitást a gazdasejt sejtciklusában a G2 fázis blokkolásával érik el úgy, hogy gátolják a CDC2 kináz enzimet, amely a mitózisba történő továbblépést segíti elő (van Vliet és Ketlay, 2001). A felfúvódásos sejthalált előidéző toxin termelését nemcsak *Campylobacter* fajoknál mutatták ki, hanem számos más patogén mikroorganizmus esetében is, így például *Escherichia coli* (Johnson és Lior, 1987), *Shigella spp.* (Okuda et al., 1997) és a *Helicobacter hepaticus* (Young et al., 2000) izolátumoknál. A toxint kódoló géncsoportot (*cdtABC*) Volokhov és munkatársai (2003) *Campylobacter jejuni* izolátumok microarray alapú azonosítására használták.

A baktériumok patogenitásának kialakulásához hozzájárul a **vas megszerzésének** képessége a gazdaszervezettől. A szabad vas koncentrációja a gazdaszervezet szöveteiben túl alacsony ahhoz, hogy elősegítse a baktériumok növekedését, mivel a vas a hem komponensek komplexeiben, a transferrinben (szérumban), valamint a laktoferrinben (a nyálkahártyák felszínén) található, és ez a vas limitáció a gazdaszervezet nem-specifikus védelmét eredményezi (van Vliet és Ketlay, 2001). A *Campylobacter jejuni* a vas komponensek csupán kis mennyiségét képes hasznosítani (Field et al., 1986). Sziderofórokat nem képez, de képes más organizmusok által termelt ferrikróm és enterokelin sziderofórokat felhasználni (Pickett et al., 1992).

A lipooligoszacharidok és a lipopoliszacharidok fontos részei a Gram-negatív baktériumok sejtfalát alkotó **külső membránnak**, valamint lényeges virulencia tényezők, amelyek részt vesznek a szérum-rezisztencia kialakulásában, az endotoxicitásban és az adhézióban. A *C. jejuni* törzsek sejtfaa lipooligoszacharidokat tartalmaz, azonban néhány tanulmányban kimutatták, hogy bizonyos törzsek az O-lánchoz hasonló szerkezettel is rendelkeznek (van Vliet és Ketlay, 2001).

A reaktív oxigén intermedierek, mint a szuperoxid anion, a hidrogén peroxid és a hidroxil gyök által okozott oxidatív stressz károsíthatja a fehérjéket, a nukleinsavakat és a sejtmembránokat. A szuperoxid anion oxidatív úton károsítja a vas-kén csoportokat. Az így felszabaduló vas reagál a hidrogén peroxiddal és hidroxil gyök keletkezik, amely közvetlenül a DNS-t károsítja. A H_2O_2 emellett gátolja a sejtek növekedését, és az enzimek oxidálása révén inaktiválja azokat (Storz és Imlay, 1999). A kampilobakterek mikroaerofil baktériumok lévén a normális metabolizmus, a transzmisszió (közvetítő által történő átadás) vagy a gazdaszervezet immunrendszerének védekező mechanizmusa során keletkezett **toxikus oxigénnel szemben is védekezniük** kell. A *C. jejuni* és a *C. coli* oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusa a szuperoxid és a peroxid stressz elleni védekező rendszert foglalja magába. A szuperoxid stressz elleni védekező rendszer legfőbb

komponense a szuperoxid-dizmutáz, míg a peroxid-stressz védőrendszer két fő komponense a kataláz és az alkil-hidroperoxid-reduktáz (van Vliet és Ketlay, 2001; Bhavsar és Kapadnis, 2007).

A termofil *C. jejuni* és *C. coli* fajok a madarak belében 42 °C-on ugyanúgy megtalálhatóak, mint 37 °C-on az ember szervezetében, valamint 4 °C-on vagy más egyéb hőmérsékleteken vízben, tejben vagy húsokon, így alkalmazkodniuk kell a **hőmérséklet változásokhoz** is. A nagy hőmérséklet (hőstressz) a legtöbb baktérium esetében hősokk fehérjék (Hsp-ek) expresszióját indukálja. Ezen fehérjék chaperonként viselkednek, így előmozdítják a legtöbb celluláris fehérje összetekeredését, valamint a potenciálisan ártalmas, rosszul föltekeredett fehérjék proteolízisét (van Vliet és Ketlay, 2001). Konkel és munkatársai (1998) vizsgálataik során huszonnégy hősokk fehérjét azonosítottak a tanulmányozott *C. jejuni* törzsek esetében. *C. jejuni* genomiális DNS könyvtár immunszkrínelése során izoláltak egy hősokk fehérjét kódoló rekombináns plazmidot (pMEK20), amely a Hsp 40 chaperon családba tartozó DnaJ fehérje aminosav sorrendjének megfelelő szekvenciát tartalmazott. Megállapították, hogy *dnaJ* mutánsok nem képesek 46 °C-on telepeket képezni, így a DnaJ fehérje fontos szerepet játszik a *C. jejuni* hőtoleranciájában.

A kampilobakterek túlélését számos tényező befolyásolja, így például az aerobiózis, a tápanyagok jelenléte, a hőmérséklet és a pH. Kedvezőtlen körülmények között a *Campylobacter* fajok élő, de nem-tenyészhető állapotba (VBNC) kerülhetnek (Chaveerach et al., 2003). A *C. jejuni* VBNC formájának kialakulására és meglétére több magyarázat is született az elmúlt években. Egyes szerzők ezt az állapotot degenerált formának tekintik, míg mások azt állítják, hogy a VBNC forma egy nyugvó állapot, és a mikroba kedvező körülmények között ismét képes lehet a szaporodásra (Tholozan et al., 1999). Az élő, de nem tenyészhető sejtek morfológiája nem minden esetben tér el a tenyészhető sejtek alakjától. Tholozan és munkatársai (1999) megfigyelték, hogy egyes VBNC sejtek rövidebbek és szélesebbek a tenyészhetőkhöz képest (kokkoid alakú sejtek), míg más sejtek megtartják spirális alakjukat, és csupán hosszukban térnek el kisebb mértékben (spirális, megnyúlt sejtek). Az elmúlt időszakban több kutatócsoport is tanulmányozta ezen sejtek visszaalakulásának lehetőségeit és körülményeit. Egyes szerzők az állatokba történő passzálást írták le egyik lehetőségként, míg más szerzőknek ilyen kísérletek során nem sikerült élő sejteket visszaizolálniuk (Cappelier et al., 1999). Cappelier és munkatársai (1999) állatmodellekben vizsgálták VBNC állapotú *C. jejuni* törzsek tenyészhető formába történő visszaalakulását. Eredményeik azt mutatták, hogy mivel mind a csirkéből, mind pedig az egérből tenyészhető kampilobaktereket izoláltak vissza, a VBNC sejtek a *Campylobacter* fertőzés epidemiológiájában mindenképp fontos szerepet töltenek be. Mivel a broiler farmokon a kampilobakterek terjedésének elsődleges útvonala az ivóvíz, Chaveerach és munkatársai (2003) a dekontaminálás céljából használt savak hatását

vizsgálták kampilobakterek VBNC formájának tanulmányozásához. Eredményeik azt mutatták, hogy az élő, de nem tenyészthető sejtek terjedése a savval kezelt ivóvizekben a fertőzés egyik lehetséges formája, vagyis a savval történő kezelés nem mentesíti az ivóvizet a kampilobakterektől.

2.4.2.3. *A flagellum szerepe és jelentősége a virulenciában*

A *Campylobacter* fajok fehérje antigénjei közül a flagelláris filamentum alegysége, a flagellin a legjobban jellemzett virulencia tényező. A kampilobakterek flagelláris filamentuma mind szerkezetében, mind pedig antigenitásában szokatlan (Guerry et al., 1991). A filamentum két flagellin alegységből, a FlaA-ból és FlaB-ből áll, amelyek között közel 93 %-os az azonosság (Guerry, 1997). *Campylobacter jejuni* és *Campylobacter coli* esetében a flagellumot kódoló génlókuszt két flagellin gént (*flaA* és *flaB*) tartalmaz, amelyek egymás után azonos irányban helyezkednek el, egymástól 174 nukleotidnyi távolságra. Mindkét gén kódoló régiója szinte teljesen azonos (Wassenaar et al., 1994). A *Campylobacter* flagellumok erősen immunogén sejtfelületi szerkezetek, amelyek nélkülözhetetlenek mind a mozgás, mind pedig a virulencia szempontjából. A *flaA* és a *flaB* gének (mindkettő 1700 bázispár hosszúságú) bár egymás mellett helyezkednek el, külön promoterral rendelkeznek. Nuijten és munkatársai (2000) kimutatták, hogy a *flaB* gén nem szükséges a mozgáshoz, így valószínűleg az antigenitásbeli változékonyságért felelős, vagy csak meghatározott körülmények között van szerepe a mozgásban. Azt is bizonyították, hogy a flagellin génszekvenciák között rekombináció, delécio és duplikáció is bekövetkezhet. A két flagellin gén kifejeződését *C. jejuni* és *C. coli* esetén is vizsgálták transzkripció és mutációk analízissel. *C. coli*-nál mindkét gén átíródását megfigyelték, azonban a *flaA* gén a másik génnél magasabb szinten fejeződött ki (Guerry et al., 1990). A *flaB* gén inaktiválása kevésbé mozgékony mutánsokat eredményezett, míg a *flaA* inaktiválásával csökkent motilitású, csonka flagellumú mutánsok jöttek létre (Guerry et al., 1991). A flagellin gén duplikációjának felismerése azt is jelentheti, hogy a rekombinációs folyamatok a két gén között eltérő típusú flagellumok kialakulásához vezethet (Alm et al., 1993a; Alm et al., 1993b), vagy a különböző flagellumok a két gén eltérő kifejeződésekként jönnek létre. Ezek a folyamatok biztosíthatják a baktérium számára a környezeti változásokhoz, mint például a pH változás, különböző sókoncentrációk, a közeg viszkozitása vagy a gazdaszervezet semlegesítő antitestjeihez történő alkalmazkodást (Wassenaar et al., 1994).

A baktériumok kommunikációja a növekedésük során környezetükbe kibocsátott jelző molekulák segítségével valósulhat meg. A baktérium sejtek érzékelik ezen molekulák koncentrációját a környezetben, amely egy küszöbérték elérését követően számos celluláris választ idéz elő. Ez a jelenség az úgynevezett quorum-sensing, amelynek segítségével a baktériumok koordinálhatják a

környezetükben bekövetkezett gyors változásokra adott válasz tevékenységüket (Griffiths, 2005). A folyamat a baktérium populációban történő sejtsűrűség változás hatására bekövetkező génszabályozás egy formája. Az úgynevezett autoindukáló kémiai jelző molekulák felhalmozódása szabályozza a gének transzkripcióját. A baktériumok számos tulajdonságáról tudjuk, hogy ezen folyamat szabályozása alatt állnak, így például a szimbiózis, az antibiotikum termelés és a biofilm képzés (Jeon et al., 2003). Patogén baktériumok esetében a folyamat további előnye, hogy a gazdaszervezet fertőzése során a virulencia faktorok termelését is szabályozhatják (Griffiths, 2005).

A quorum sensing két típusát lehet elkülöníteni: a fajspecifikust és a fajok közöttit. A fajspecifikus quorum sensinget a Gram-negatív baktériumok esetében acil-homoszerin-laktonok közvetítik, míg Gram-pozitív baktériumoknál kisméretű peptidek. A fajok közötti kommunikációt az autoinducer-2 (furanozl-borát-diészter) molekulákhoz kötik (March és Bentley, 2004). A *C. jejuni* genomjában található egy LuxS fehérje ortológot kódoló gén, amely számos baktériumban az autoinducer-2 (AI-2) molekula termeléséhez szükséges, a genom azonban nem tartalmaz olyan géneket, amelyek acil-homoszerin-lakton-szintetáz enzimeket kódolnak (Elders és Park, 2002). *Kampilobakterek* esetében az AI-2 által közvetített quorum sensing befolyásolja a *flaA* gén transzkripcióját (Griffiths, 2005). Jeon és munkatársai (2003) kimutatták, hogy a *luxS* génben bekövetkező mutáció hatással van a *flaA* gén átíródására, azonban nem befolyásolja a *flaB* gén átíródására. A mutációt hordozó törzs esetében nem volt AI-2 termelés kimutatható, amely a mozgási képességet jelentős mértékben nem befolyásolta, valamint a flagellum szerkezetében sem tapasztaltak különbséget a vad típusú törzshöz képest, azonban primer hosszabbítási vizsgálatok során jelentős csökkenés volt megfigyelhető a *flaA* gén transzkripciójában.

2.5. Élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata, patogének kimutatása

Az élelmiszerek biztonságának és megfelelő minőségének biztosítása érdekében a romlást okozó és patogén mikroorganizmusok detektálása alapvető eljárás az élelmiszerek vizsgálata során. Az élelmiszerekkel összefüggésbe hozható patogén baktériumok detektálása gyakran bonyolult folyamat a ritkábban előforduló, újonnan felbukkanó törzsek, valamint számos baktérium terjedési útvonalának még tisztázatlan volta miatt (Mead et al., 1999). A mikrobiológiai szennyezettség mértékének megállapítása során nemzetközi testületek által szabványosított módszereket és eljárásokat kell alkalmazni. Hazánkban az élelmiszermintákra vonatkozó mikrobiológiai határértékeket a 4/1998 EüM rendelet határozza meg (amelyet a 46/2007 EüM rendelet jóváhagyott), azonban a határértékek tekintetében a Bizottság 2073/2005/EK rendeletét is

figyelembe kell venni, amely meghatározza azt is, hogy a különböző mikroorganizmusok kimutatása során milyen szabványos módszereket kell alkalmazni.

Az élelmiszerekben előforduló mikrobák kimutatása hosszú múltra tekint vissza. Számos, ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszert több mint száz éve fejlesztettek ki. A hagyományos kimutatási módszerek az élelmiszerekben jelenlévő élő baktérium sejtek izolálásához és számának meghatározásához specifikus mikrobiológiai tápközegeket igényelnek. Ezek a módszerek kellően érzékenyek, nem túl drágák és mind kvalitatív, mind kvantitatív adatokat szolgáltathatnak az élelmiszermintában jelenlévő mikrobák számát és természetét illetően. Azonban a hagyományos módszerek igen időigényesek, az eredmények gyakran csak több napos inkubálást követően értékelhetőek, mivel a mikroorganizmusoknak szemmel látható telepeket kell kialakítaniuk a táptalajokon (de Boer és Beumer, 1999; de Boer, 2007). A módszertani fejlesztések ezért évtizedek óta az alternatív és gyors eljárások irányába haladnak, amelyek segítségével lehetőség nyílik a romlást okozók és patogének gyors kimutatására, azonosítására és számuk pontos meghatározására.

2.5.1. Hagományos mikrobiológiai módszerek

Tradicionalisan a baktériumok kimutatása tenyésztésen vagy szaporodásmérésen alapuló eljárásokkal történik. Az élelmiszerminták nem-szelektív vagy szelektív táplevesekben történő elődúsításával a sérült, de életképes sejtek száma a kimutathatósági szintre növelhető (Zhao és Doyle, 2001). A vizsgálandó élelmiszermintától függően azonban egy újabb, 8-24 órás dúsítási lépés is szükséges lehet a mikroba kimutatásához, illetve számának meghatározásához (Gracias és McKillip, 2004). A dúsító folyadékba oltott mikrobák szaporodása során kompetíció figyelhető meg azon fajok között, amelyek tolerálják, vagy éppen a hasznukra fordítják a szelektív körülményeket. Ritka azonban, hogy egy heterogén mikrobiótából az alkalmazott szelektív tápközegben csak a kimutatni kívánt mikroorganizmus szaporodjon. Ideális körülmények között a dúsítást követően a cél mikroba dominál a tápközegben, azonban a legtöbb esetben a nem-gátolt versengők szintén nagy számban lehetnek jelen már a beoltásnál, vagy a dúsítás végén a cél mikroorganizmus szaporodása következtében megváltozott szelektív körülmények hatására. A szelektív dúsítókbán alkalmazott szelektív komponensek hatékonyságát befolyásolja a komponensek (például az antibiotikum) bármilyen szinergista vagy antagonista hatása, továbbá a vizsgált élelmiszerminta egyes komponensei is csökkenthetik hatékonyságukat (Holbrook, 2000). Az időigényes dúsítás tehát sok esetben nélkülözhetetlen a kimutatni kívánt mikroba sérült sejteinek detektálásához, illetve jelenlétének megerősítéséhez. A dúsítási lépést kihagyva, különböző szelektív tápközegekre kioltva az élelmiszermintát, közvetlenül is meghatározható a romlást okozók vagy patogének

jelenléte. A különböző kromogén és fluorogén szubsztrátumok szelektív tápközegekben történő alkalmazásával a detektálás, a sejtkoncentráció meghatározás és az azonosítás közvetlenül a lemezekon megvalósítható (Manafi, 1996), azonban megerősítő vizsgálatok elvégzése még ezekben az esetekben is szükséges.

2.5.1.1. Termofil *Campylobacter* fajok kimutatása hagyományos módszerekkel

A kampilobakterek már viszonylag kis számban képesek megbetegedést okozni. Robinson (1981) saját magán elvégzett kísérlete alapján megállapította, hogy a kampilobaktereknek igen kicsi az infekciós dózisa; már 500 sejt is képes egészséges emberekben fertőzést okozni, ezért kimutatásukhoz nagy érzékenységu módszerekre van szükség. A közvetlen kioltás nem alkalmas élelmiszerek vagy humán minták vizsgálatára alacsony mikrobaszám esetén (Doyle és Roman, 1982), mivel a szelektív tápközegekre történő közvetlen kioltás során kis mennyiségben lehet csak a mintát az agar felületére juttatni, továbbá a szilárd mintákat előzőleg szuszpendálni és homogenizálni kell, amelynek következtében az esetleg kis számban jelenlévő kampilobakterek kihígulnak. A kampilobakterek a környezetben és az élelmiszerekben mindig nagyszámú kísérő mikrobióta mellett fordulnak elő (Doyle és Roman, 1982), így élelmiszerekből a hagyományos módszerekkel történő kimutatásuk első lépése a szelektív dúsítás, amelyet szelektív táptalajra történő kioltás és biokémiai módszerekkel történő megerősítés követ (Corry et al., 2003). A dúsításra akkor van szükség, ha a kimutatandó baktérium kis számban van jelen, azonban abban az esetben, ha a cél mikroorganizmus koncentrációja nagyobb, a módszer az analizálandó minta közvetlen kioltással való vizsgálatával párhuzamosan is alkalmazható. Newell és munkatársai (2001) korábban megfigyelték, hogy a vizsgált mintából közvetlen kioltás során csak egyféle *Campylobacter jejuni* törzs volt kitenyészthető, azonban ugyanazon minta dúsítása után egy másfajta törzset is izoláltak, ami azt mutatta, hogy a dúsítás során egyes *C. jejuni* törzsek jobban szaporodtak ugyanezen faj más törzseihez képest. Más megfigyelések szerint a dúsítást követően a *C. jejuni* dominált a vizsgált mintákban jelenlévő *C. coli* törzsekhez képest (Rönner et al., 2004), valamint a dúsítás során alkalmazott eltérő hőmérséklet (37 illetve 42 °C) is befolyásolta az izolálás eredményét (Scates et al., 2003). Jelenleg az élelmiszermintákból történő *Campylobacter* kimutatást az EN ISO 10272-1:2006 szabvány szerint kell elvégezni. Az elmúlt években törekvések folytak olyan új módszerek kidolgozására, amelyek a termofil kampilobakterek gyors és érzékeny kimutatását teszik lehetővé. Axelsson-Olsson és munkatársai 2007-ben egy protozoonnal történő együtt-tenyésztéses módszert publikáltak kampilobakterek szelektív dúsítására és azonosítására. Az elmúlt időszakban azonban ennél egyszerűbb molekuláris biológiai módszerek is kifejlesztésre kerültek a patogén *Campylobacter* fajok detektáláshoz és identifikáláshoz (Waage et al., 1999).

2.5.2. Alternatív és gyors mikrobiológiai módszerek

Az élelmiszerekben előforduló patogének ellenőrzéséhez hatékony kimutatási és vizsgálati módszerek szükségesek. A hagyományos mikrobiológiai módszereket közel egy évszázada alkalmazzák a patogén mikrobák élelmiszerekből történő kimutatásához és azonosításához. Megbízhatóságuk mellett a hagyományos módszerek nagyon idő- és munkaigényesek, így nem alkalmasak a modern minőségbiztosítási rendszerekben a lehetséges veszélyekre való gyors válaszok megadására. Ennek eredményeképpen az elmúlt 25 évben számos gyors módszert fejlesztettek ki a vizsgálati idő csökkentése érdekében (Yang és Bashir, 2008). A mikrobák (köztük a patogének) kimutatására és/vagy azonosítására alkalmazható alternatív és gyors módszerek között lehet megemlíteni a miniaturizált biokémiai tesztek (Fung, 2002), a baktérium metabolitok mérésén alapuló elektrokémiai módszereket (Ivnitski et al., 2000; Yang és Bashir, 2008), a nem hagyományos mikroszkópos eljárásokat (például DEFT) és az áramlásos citometriát (Raybourne és Tortorello, 2003), a lumineszcens technikákat (Tu et al., 2005), a nagy specifikusságú nukleinsav-alapú módszereket (Naravaneni és Jamil, 2005), valamint az antitest alapú eljárásokat (Yu et al., 2001; Fung, 2002). A 3. táblázatban a kimutatásra, azonosításra, illetve mennyiségi meghatározásra alkalmazható alternatív és gyors mikrobiológiai módszerek összehasonlítása látható érzékenységük, specifikusságuk és gyorsaságuk alapján.

3. táblázat: A hagyományos, az alternatív és a gyors módszerek összehasonlítása szenzitivitás, specifikusság és időigény alapján (de Boer és Beumer, 1999; de Boer 2007)

Módszer	Érzékenység (kimutatási határ, TKE/ml vagy g)	Specifikusság	Vizsgálat időtartama
Tenyésztéses módszerek	1	jó	1-3 nap
Biolumineszcencia	10^4	nem specifikus	0,5 óra
Áramlásos citometria	10^2 - 10^3	jó	0,5 óra
DEFT	10^3 - 10^4	nem specifikus	0,5 óra
Impedimetria	1	közepes/jó	6-24 óra
Immunológiai módszerek	10^4 - 10^5	közepes/jó	1-2 óra
Nukleinsav alapú módszerek	10^3	kiváló	6-12 óra

1/ A **biolumineszcencia módszer** a luciferáz enzim jelenlétében lejátszódó luciferin és ATP reakcióján alapszik. Az enzimes reakció hatására az ATP fénykibocsátás mellett lebomlik és a felszabaduló fény luminométerrel detektálható. A módszer gyors és egyszerű eljárás, amelynek segítségével a mikrobaszám közelítőleg megbecsülhető (Stannard és Gibbs, 1986). Az élelmiszer nyersanyagok, mint a növényi és állati szövetek azonban ATP-ben gazdagok, amely lassabban és nem teljesen bomlik le a sejtek szétesése során. Ezért a mikrobiológiai szennyezettség

meghatározásakor a mikroba sejtek hatékony elválasztása, valamint a nem-mikroba sejtek eltávolítása fontos a vizsgálat elvégzése előtt. A módszert sikeresen alkalmazták friss húsok és tejek minőségének ellenőrzéséhez, starterkultúrák aktivitásának méréséhez, valamint UHT élelmiszerek sterilitásának ellenőrzéséhez (Maráz et al., 2006). A módszer továbbfejlesztésével (antitest-alapú biolumineszcencia, fág-alapú biolumineszcens eljárás) lehetőség nyílt egyes patogének kimutatására is (Griffith és Brovko, 2003).

2/ Az **áramlásos citométerek**ben a részecskék igen nagy sebességgel haladnak át a megfelelő detektorokkal ellátott megvilágító zónán, ahol megtörténik a pulzusok intenzitásának mérése, amely kifejezi a szóródó fény mértékét. Az impulzusok elektronikus szétválogatása alapján a vizsgált részecskék különböző paramétereit lehet egyidőben meghatározni (Davey és Kell, 1996). Az áramlásos citometria alkalmazásával nagyszámú sejt vizsgálata valósítható meg nagyon rövid időn belül, így gyorsan kapható információ komplex heterogén minták esetén (Robinson, 2004), továbbá mind kvalitatív, mind kvantitatív mérésekre alkalmazható. Fluoreszcens festékekkel vagy fluorogén szubsztrátumokkal kombinálva az eljárást elkülöníthetők egymástól az élő, az élő, de nem tenyészthető, illetve a holt sejtek is. Sikeresen alkalmazták már a módszert tejből baktérium sejtek kimutatására (Gunasekera et al., 2003).

3/ A **direkt epifluoreszcens szűrési eljárás (DEFT)** mikroorganizmusok közvetlen mikroszkópos számlálására alkalmas módszer. A vizsgálat során először az élelmiszer minta membránfilteren keresztüli szűrése történik, amely lehetőséget nyújt a mikroorganizmusok koncentrálására, majd a sejteket közvetlenül a membránon fluoreszcens festékekkel (leggyakrabban akridin narancssal) festik. A preparátumot ezt követően tárgylemezre helyezve epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgálják. A módszert nyers tejek mikrobiológiai monitorozására fejlesztették ki, de higiéniai vizsgálatokra is jól alkalmazható (Sharpe, 2000). A módszer továbbfejlesztésével (antitest-direkt epifluoreszcens szűrési eljárás = Ab-DEFT) lehetőség nyílt *E. coli* O157:H7 törzsek kimutatására is (Raybourne és Tortorello, 2003).

4/ Az **impedimetria** a folyékony oldatok különböző mértékben történő elektromos vezetőképességének elvén alapszik. A mikroorganizmusok szaporodása és tápanyag metabolizmusa során folyadék tenyészetekben a nagyméretű molekulák kisebb méretű molekulákká alakulnak, megváltoztatva ezáltal a tápközeg elektromos vezetőképességét és ellenállását. Az elektromos impedancia, kapacitancia és konduktancia mérésével a mikroorganizmusok száma megbecsülhető, ugyanis minél nagyobb számban vannak jelen mikrobák a folyékony közegben, annál gyorsabban változnak az említett paraméterek (Fung, 1991). A módszer széles körben alkalmazott eljárás

élelmiszerek mikrobiológiai szennyezettségének felmérésében, illetve alkalmazható patogén baktériumok detektálására is (Bolton és Gibson, 1994; Gibson, 2003).

5/ Az antigén és antitest reakciókon alapuló **immunológiai módszereket** már évtizedek óta alkalmazzák mikroorganizmusok kimutatására és jellemzésére az orvosi és állatorvosi mikrobiológiai diagnosztikában. Az immunológiai reakciók számos változatát és típusát fejlesztették ki az elmúlt évek során élelmiszerekben előforduló patogén mikrobák kimutatásához, így például immunkromatográfiás tesztek, direkt és indirekt ELISA módszereket és fluoreszcens antitest eljárásokat, amelyekkel lényegesen megnövelték a módszerek specifikusságát és gyorsaságát (Fung, 2002).

Az élelmiszerekben patogén mikroorganizmusok a vonatkozó rendeletekben meghatározott (viszonylag kis) határértékek felett nem fordulhatnak elő, ezért a kórokozók kimutatására eddig felsorolt módszerek az érzékenységet figyelembe véve csak irreálisan nagy mikrobaszám esetén, vagy (elő)dúsítást követően alkalmasak patogének detektálására. Bár a gyors vizsgálatok időtartama a hagyományos módszerekhez képest jelentősen lerövidül, a dúsítási lépés miatt a kimutatás időigénye még így is számottevő. Egy módszer kiválasztása esetén fontos szempont az eljárás specifikussága is. Amint a 3. táblázatban is látható, a nukleinsav alapú módszerek kiváló specifikussággal rendelkeznek, ezért a patogének kimutatásában, azonosításában és tipizálásában egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a molekuláris biológiai technikák. Azonban még kevés az olyan megbízható molekuláris módszer, amelynek széleskörű alkalmazhatóságát vizsgálták, illetve amelyet validáltak. Az alternatív módszerek teljesítmény jellemzőinek meghatározását, illetve a referencia módszerrel (klasszikus kimutatási módszerrel) történő összehasonlítását (validálását) az EN ISO 16140:2003 szabvány alapján lehet megvalósítani.

2.6. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős patogén baktériumok kimutatására alkalmazható molekuláris biológiai módszerek

A korábbiakban tárgyalt, detektálásra és jellemzésre alkalmas gyorsmódszerek a mikroorganizmusok genetikai tulajdonságainak fenotípusos kifejeződésén alapuló eljárások. Az élőlények fenotípusát azonban számos környezeti tényező befolyásolhatja, mint például a hőmérséklet, pH, a vízaktivitás, toxinok, valamint környezeti és kémiai stresszhatások. Ezen tulajdonságok vizsgálata tehát a patogének meghatározása során kevésbé megbízható eredményt adhat. Ezzel szemben a sejtek genomja jóval stabilabb, egy baktériumsejtben bekövetkező természetes mutáció gyakorisága nagyon csekély, átlagosan a 10^{-7} - 10^{-8} nagyságrendbe esik.

Ráadásul a genom egy élőlény valamennyi típusú sejtjében gyakorlatilag azonos nukleotid szekvenciával jellemezhető, ezért alkalmazásukkal nagy biztonsággal azonosíthatók az eltérő morfológiájú sejteket létrehozó mikroorganizmusok is. A DNS valamennyi, eddig azonosításra vagy jellemzésre használt sejtalkotónál (például fehérjék, lipidek, lipopoliszacharidok) ellenállóbb, ami szintén megnöveli a vizsgálatok biztonságosságát és alkalmazhatóságát. Mindezek következtében az elmúlt években egyre nagyobb lett az igény a mikrobiológiai diagnosztikában a fenotípusos tulajdonságok vizsgálatán alapuló eredmények megerősítésére, valamint a mikrobák pontos azonosítására nukleinsav alapú módszerekkel (Fung, 2002).

2.6.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A nukleinsav alapú eljárások szerepe a patogének kimutatásában mára már nélkülözhetetlenné vált. A nyolcvanas évek végén kifejlesztett polimeráz láncreakció (Mullis et al., 1986) forradalmasította a molekuláris diagnosztikát. A PCR technika elterjedését megelőzően alkalmazott molekuláris biológiai módszerek munka- és időigényesek voltak, valamint magas technikai szaktudást igényeltek (Maráz et al., 2006). A PCR eljárás a polimeráz enzim DNS szálak másolására való képességét használja fel, az enzim ugyanis a DNS szálhoz kötődött rövid (primer) szekvencia 3' irányú meghosszabbítását végzi. Abban az esetben, ha két primer kapcsolódik a mintául szolgáló DNS két szálához, a primerek által közrefogott szekvencia minden PCR ciklusban exponenciálisan amplifikálódik. Minden ciklus három lépésből áll: (i) a DNS hődenaturációja, amelyben a DNS két szála szétválik; (ii) a primer kötődési lépés, amelyben a primerek alacsonyabb hőmérsékleten a komplementer szekvenciákhoz kapcsolódnak; (iii) és egy hosszabbítási lépés, amelyben a DNS polimeráz enzim a primerek által közrefogott szekvenciákat lemásolja (Innis és Gelfand, 1990; Hayden, 2004). A polimeráz láncreakció számos változatát fejlesztették ki az elmúlt évek alatt, amelyek jól alkalmazhatóak az élelmiszerekben előforduló patogének kimutatására. Ilyen eljárások például a nested (fészek)-PCR, a reverz transzkriptáz PCR, a multiplex PCR és a valós idejű (real-time) PCR módszerek (Sanderson és Nichols, 2003; Maráz et al., 2006).

2.6.2. RFLP (restriktációs fragmentum hossz-polimorfizmus) és PCR-RFLP vizsgálatok

Teljes baktérium genomok esetében az RFLP módszerek közül a makrorestriktációs RFLP jól alkalmazható molekuláris tipizálási eljárás, amelynek lényege a kromoszómális DNS ritkán hasító restriktációs enzimmel történő hasítása, majd a kapott nagyméretű fragmentumok pulzáló gélelektroforézissel való elválasztása. Az így kapott komplex DNS mintázatot általában 5-30 jól elkülönülő fragmentum képezi, amelyek mérete a vizsgált mikrobától és az alkalmazott enzimtől

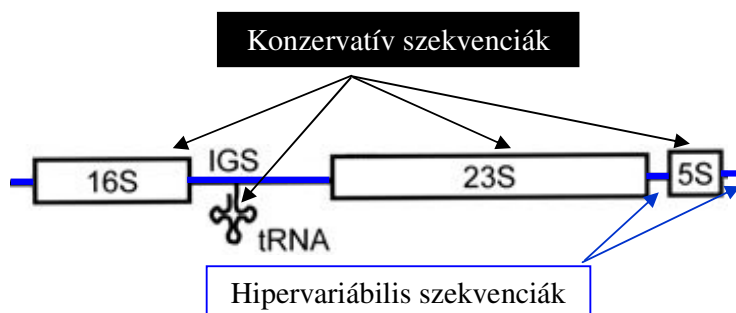
függően 10 és 800 kbp. között található. A módszer előnye, hogy jól reprodukálható és megfelelő diszkriminációs képességgel rendelkezik adott fajon belüli törzsek elkülönítésére (Fitzgerald és Swaminathan, 2003). Az eljárás eukariótáknál is széles körben alkalmazott, azonban élesztőgombák esetében a kromoszómák számának és méretének meghatározásával (kariotipizálással) számos esetben lehetőség nyílik az izolátumok azonosításra és tipizálására restrikciós enzimes hasítás nélkül is (Carle és Olson, 1985; Gomes et al., 2000).

A PCR és az RFLP módszer kombinálásával (PCR-RFLP analízis) a vizsgált izolátumok tipizálása érdekében az eljárás során olyan polimorfikus célszekvenciákat kell kiválasztani, amelyek vizsgálatával a faj alatti elkülönítés megvalósítható. A vizsgálandó szekvencia felszaporítása génspecifikus primerekkel polimeráz láncreakció során történik, így a sokszorosítandó rész bázissorrendjének előzetes ismerete szükséges. Ezt követően a felszaporított PCR termékeket sűrűn hasító specifikus restrikciós endonukleázokkal hasítva a kapott fragmentumok RFLP profilját gélelektroforézissel lehet előállítani. A kapott mintázatok jól reprodukálhatók, azonban a módszer diszkriminációs képessége nagymértékben függ az alkalmazott restrikciós enzimek specifikusságától és számától (Fitzgerald és Swaminathan, 2003).

A riboszómális RNS-ek univerzális, állandó és igen korlátozott funkciójú molekulák, amelyeket a környezeti változások nem befolyásolnak. Az rRNS-t kódoló gének (operonok) erősen konzervatív szekvenciákat és variábilis doméneket egyaránt tartalmaznak, így a filogenetikai kapcsolatok vizsgálatának legalkalmasabb célszekvenciái (Uyttendaele és Debevere, 2003). Az rDNS gének több (1-15) kópiában egymás mellett található meg a baktériumok genomjában (Klappenbach et al., 2000), továbbá közbeeső szekvenciákat is tartalmaznak, mint például az intergénikus elválasztó régiók (IGS), amelyek az érési folyamat további célszekvenciái, mivel a transzkripciót követően újraligálás nélkül kihasadnak (Evguenieva-Hackenberg, 2005). A baktérium rRNS operon sematikus vázlata a 2. ábrán látható.

A taxonómiában és az identifikálásban az rRNS-t kódoló gének különleges jelentőségre tettek szert, vizsgálatukra többféle módszer is kidolgozásra került. Az rDNS-RFLP vagy másnéven ARDRA (amplifikált rDNS RFLP analízis) módszer lényege, hogy az rDNS különböző részeit (leggyakrabban a 16S rDNS-t) univerzális primerek segítségével amplifikálják, majd specifikus restrikciós enzimek segítségével hasítják. Az így kapott fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elválasztják és a kapott mintázat alapján, referencia (általában típus) törzsekkel való összehasonlítással identifikálják. Amennyiben az amplifikálást variábilis régiókra specifikus primerekkel valósítják meg, a restrikciós mintázat molekuláris ujjlenyomattá tekinthető és törzsek

elkülönítésére is alkalmas (Deák, 2006b; Rademaker és Savelkoul, 2004). Abban az esetben, ha egy genomon belül az ismétlődő rDNS operonok kismértékben eltérő szekvenciával rendelkeznek, az ujjlenyomat profilok összetettebbé válhatnak.



2. ábra: A baktériumok rDNS operonjának szerkezete (Evguenieva-Hackenberg, 2005)

Baktériumok nemzetség és fajszintű meghatározása során azonban nemcsak a 16S rDNS vizsgálata alkalmazható. A 23S és a 16S-23S rDNS köztes átíródó (ITS) szekvenciáinak vizsgálatára is található példa a szakirodalomban. A 23S rDNS hasonlóan a 16S rDNS-hez igen konzervatív, azonban variábilis régiókat is tartalmaz (Kolbert et al., 2004). Bár a 23S rDNS-t kódoló gén több restrikciós endonukleáz felismerő hellyel rendelkezik növelve ezáltal az RFLP módszer specifikusságát és diszkriminációs képességét (Hurtado és Owen, 1997), mégis kevesebb olyan univerzálisan alkalmazható primer áll a rendelkezésre, amelyekkel megvalósítható a baktériumok kimutatása és azonosítása (Maiwald, 2004).

2.6.3. Véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS (RAPD) vizsgálat

A Williams és munkatársai (1990) és Welsh és munkatársai (1990) által kidolgozott eljárás a teljes genom polimeráz láncreakcióval történő vizsgálatát jelenti, a véletlenszerűen felszaporított amplikonok gélelektroforézises mintázatának analízisével. A sejtekből kivont genomiális DNS-t egyetlen rövid indító szekvenciával szaporítják fel, amely nem teljes homológia esetén is képes az egyszálú DNS-hez kapcsolódni a PCR reakció során alkalmazott, a szoros PCR körülménynél alacsonyabb (36-42 °C-os) primer kötődési hőmérséklet következtében (Tyler et al., 1997; Fitzgerald és Swaminathan, 2003). PCR termékek akkor keletkeznek, amikor a primer kötődési helyei az amplifikációs távolságon belül (kevesebb, mint 5000 bázispár távolságban) helyezkednek el a megfelelő irányban. A termékek hossza, a primer kötődésének hatékonysága és így a felszaporítás is változik a kapcsolódási helyek függvényében. Ennek következtében erősebb és gyengébb amplikonok is létrejönnek, ami megnehezíti az eredmények értelmezését (Wassenaar és

Newell, 2000). A reakciósorozat végére az indítószekvenciától és a PCR reakció körülményeitől függően több, különböző méretű fragmentum keletkezik, amely DNS darabok elválasztása agaróz gélelektroforézissel történik. A kapott mintázat a vizsgált mikroba törzs ujjlenyomata, így a módszer alkalmas az azonos fajhoz tartozó törzsek elkülönítésére (tipizálására) (Rademaker és Savelkoul, 2004). A módszer hátránya azonban, hogy nehezen reprodukálható, ami ellentétben áll az eljárás gyorsaságával és költség-hatékonyságával (Wassenaar és Newell, 2000). Nowrouzian és munkatársai (2001) többek között a bélmikrobiótából származó *E. coli* izolátumok tipizálására alkalmazták a módszert, míg Tynkkynen és munkatársai (1999) élelmiszerekből származó, illetve humán eredetű *Lactobacillus rhamnosus* törzsek jellemzésére használták az eljárást. Abban az esetben azonban, ha a módszer sztenderdizálásra kerül, különösen jól alkalmazható izolátumok egyidejű összehasonlítására, tipizálására.

Törzsek tipizálására gyakran alkalmazott módszer a mikroszatellit PCR. A mikroszatellitek, vagy egyszerű szekvencia ismétlődések (SSR-ek) a DNS néhány (5-6) bázispár hosszúságú, tandem ismétlődő szakaszai. A prokarióták és eukarióták genomjában egyaránt megtalálhatók mind a fehérjéket kódoló, mind pedig a nem kódoló régiókban. Úgy tekintik, hogy ezen mikroszatellit szekvenciák az evolúció során neutrális DNS markerként szolgáltak. A változó számú ismétlődő egységekben fellépő hossz polimorfizmus valószínűleg a DNS polimeráz enzim replikáció során bekövetkező csúszásából adódik. A mikroszatelliteket már korábban is alkalmazták populáció genetikai vizsgálatokra és tipizálásra, mivel számos előnnyel rendelkeznek, így például polimorfikusak, multiallélikusak, jól reprodukálhatók és PCR-rel detektálhatók (Nascimento et al., 2004).

A miniszatellit szekvenciák (VNTR szekvenciák) általában 9-60 nukleotid hosszúságú, több kópiás ismétlődések, amelyek száma a genomban igen variábilis (Ingavale et al., 1998). Az M13 bakteriofág köpeny fehérjét kódoló gén tandem ismétlődő szekvenciáját Huey és Hall (1989) hibridizációs próbaként alkalmazta *E. coli* törzsek vizsgálata során. Megfigyeléseik szerint ezen miniszatellit szekvencia alkalmazásával jelentős variabilitás volt kimutatható mind környezeti, mind pedig klinikai izolátumok esetében. Mivel a szekvencia számos eukariótában, prokariótában és vírusban megtalálható, gyakran alkalmazzák RAPD-PCR reakcióban primerként, például tejsavbaktériumok (Rossetti és Giraffa, 2005), vagy *Bacillus cereus* izolátumok (Ehling-Schulz et al., 2005) tipizálására.

2.6.4. Denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)

A denaturáló gradiens gélelektroforézis az egyik legelterjedtebb, tenyésztéstől független, közösségek vizsgálatára alkalmas ujjlenyomat technika. A módszer azonos hosszúságú, de eltérő szekvenciájú, rövid PCR amplikonok elválasztásán alapuló gélelektroforézises eljárás, amely alkalmas a DNS amplikonok közötti akár egyetlen bázisnyi különbség kimutatására. Az amplikonok elválasztása denaturáló gradiens poliakrilamid gélben történik eltérő denaturációs (olvadási) tulajdonságaik alapján. Az eljárás elméleti vonatkozásait először Fisher és Lerman írta le 1983-ban. A poliakrilamid gélben a denaturáló közeget urea és formamid segítségével hozzák létre. A DGGE során a kétszálú DNS darabok folyamatosan növekvő denaturáló környezetben haladnak előre a gélben, majd a szekvenciájuk által meghatározott olvadási pontjukon részlegesen denaturálódnak, H-híd kötéseik felhasadnak (először az A-T, később a G-C bázispárok összetartó kötések válnak el), így a molekula mobilitása (vándorlási sebessége) is jelentősen lecsökken a gélben. Az eljárás során első lépésben a genomiális DNS-t specifikus indító szekvenciákkal felszaporítják, a primerek közül az egyik egy 30-40 bázispár hosszúságú, GC gazdag régiót (GC kapsot) tartalmaz az 5' végén. Ez biztosítja, hogy a vizsgált DNS darab részlegesen duplaszálú maradjon az elektroforézis végén is, és az amplikonok vándorlását a legalacsonyabb olvadási domén határozza meg (Ercolini, 2004). A DGGE eljárás során viszonylag rövid, 100-500 bázispár hosszúságú fragmentumok vizsgálata valósítható meg hatékonyan.

A DGGE módszernek két típusa ismert. A merőleges eljárásnál a lineáris denaturáló gradienst a gélben balról jobbra haladva alakítják ki, az elektroforézis irányára merőlegesen. A párhuzamos módszer esetén a gélben lefelé haladva lineárian nő a denaturáló koncentráció, párhuzamosan az elektroforézis irányával. Ennek az eljárásnak az előnye, hogy egy gélen egyszerre több minta is vizsgálható elkülönítve, ellentétben a merőleges módszerrel, ahol csupán egyetlen DNS minta vagy minták keveréke analizálható egy poliakrilamid gélben. A merőleges DGGE vizsgálat azonban nemcsak a DNS polimorfizmus kimutatására alkalmas, hanem a párhuzamos eljárás során alkalmazható optimális denaturálószer-koncentráció meghatározására is használható (Sheffield et al., 1990).

A módszert elsősorban környezeti minták mikrobaközösségeinek tenyésztés nélküli meghatározására dolgozták ki, illetve a mikrobaközösség dinamikájának megfigyelésére alkalmazzák a környezeti hatások változása során. Vizsgálták többek között talaj, tengervíz és tavak vizeinek mikrobaközösségeit, de az emésztőrendszerben előforduló mikrobióta, a szennyvíztisztítás

során a bioreaktorokban megtalálható mikroorganizmusok és klinikai minták esetén is találhatunk példákat a módszer alkalmazására (Ercolini, 2004). Ishii és munkatársai (2000) komposztálási folyamat során bekövetkező szukcesszió vizsgálatát végezték el PCR-DGGE-vel. A módszert az élelmiszer mikrobiológiában 1999-ben alkalmazták elsőként (Ampe et al., 1999) mexikói fermentált kukoricatészta mikroorganizmusainak feltérképezésére. Azóta számos élelmiszer mikrobaközösségét vizsgálták a módszer segítségével. Cocolin és munkatársai (2000) élesztők dinamikáját vizsgálták a borerjesztés folyamán PCR-DGGE módszerrel, Manzano munkatársaival (2004) a *Saccharomyces sensu stricto* törzseinek elkülönítésére alkalmazta az eljárást. Szintén Cocolinék (2002) nyers tej élesztőbiótáját tanulmányozták, De Vero és munkatársai (2006) ecetek ecetsavbaktérium populációját vizsgálták, míg Spano és munkatársai (2007) vörös borok *Lactobacillus plantarum* és *Oenococcus oeni* populációját jellemezték szintén ezzel az eljárással.

2.6.5. Heteroduplex mobilitási analízis (HMA)

A heteroduplex analízis egy gyors és viszonylag olcsó módszer DNS szekvenciák közötti rokonsági kapcsolatok megállapítására. A vizsgálat azon a megfigyelésen alapszik, hogy a kétszálú DNS-ben bekövetkező bázis-összekapcsolódási hibák, valamint nukleotidok beillesztése vagy kiesése következtében szerkezeti elváltozások jönnek létre, amelyek a poliakrilamid gélben lecsökkentik ezen fragmentumok elektroforetikus mobilitását (Wang és Griffith, 1991; Upchurch et al., 2000). Heteroduplexeket elkülönült PCR reakciókban felszaporított, rokon, leggyakrabban azonos génekből származó DNS-ek hibridizálásával lehet előállítani. Ha ezeket a termékeket elválasztják egymástól poliakrilamid gélen, két, a kontroll homoduplexeknél lassabban haladó heteroduplex sávot figyelhetnek meg (Delwart et al., 1995).

A módszert és különböző változatait igen széles körben alkalmazták már, így például kezdetben Fuller-Pace és munkatársai (1984) genetikai rekombináció kimutatására elektronmikroszkóp segítségével, majd később Jensen és Hubren (1996) *Salmonella* szerovariánsok azonosítására. Az eljárást vírusok esetében elterjedten alkalmazzák a genetikai variabilitás tanulmányozására. Arens (1999) megfigyelései szerint HIV vírusok esetében a módszer legnagyobb előnye, hogy alkalmas az izolátumok szkrínelésére, és segítségével a genetikai kapcsolatok is meghatározhatók DNS szekvenálás nélkül. Merrill és munkatársai (2003) megállapították, hogy fluoreszcensen jelölt próbákat alkalmazva az eljárás hatékony módszer a környezeti mintákból származó *Bacillus* fajok kimutatására és a *Bacillus anthracis* elkülönítésére is. Moreno, C. és munkatársai (2002) megfigyelték, hogy heteroduplex analízis segítségével tiszta tenyészetekből kiindulva a *Vibrio* nemzetségbe tartozó típus törzsek és környezeti izolátumok esetén a polimorfizmus jól kimutatható.

2.6.6. További molekuláris biológiai módszerek

A fent említett nukleinsav alapú eljárásokon kívül számos más molekuláris módszer alkalmazható patogén baktériumok tipizálására.

Az **MLST technika** kisszámú (leggyakrabban 7-10) úgynevezett háztartási gén (house-keeping gene) PCR-rel felszaporított fragmentumainak szekvencia-meghatározásán alapul. Az eljárás során 450-500 bázispár hosszúságú DNS darabok bázissorrendjét határozzák meg, majd a kapott szekvenciák kiértékelése során a nukleotid különbségekhez rendelt allélszámok segítségével szekvencia típusokat határoznak meg. Ezen típusok esetleges korábbi előfordulása adatbázisokban ellenőrizhető, illetve az adatbázisokban az új szekvencia típusok el is helyezhetők (Hanage et al., 2004; <http://www.mlst.net>).

Szintén széles körben alkalmazott eljárás az **AFLP módszer**, amelyet Vos és munkatársai (1995) dolgoztak ki. Az eljárás során a genomiális DNS-t két restrikciós enzimmel elhasítják, amelyek közül az egyik átlagos gyakorisággal hasító, a másik pedig egy gyakran hasító restrikciós endonukleáz. Az így keletkezett fragmentumok végeihez speciális duplaszálú oligonukleotid adaptereket ligálnak, majd az így módosított fragmentumokat adaptor specifikus primerekkel, specifikus körülmények között PCR reakcióban felszaporítják. A gélelektroforézissel elválasztott fragmentumok a vizsgált mikroba ujjlenyomatát képezik, így a módszer jól alkalmazható különböző törzsek tipizálására (Aarts et al., 1998; Fitzgerald és Swaminathan, 2003; Rademaker és Savelkoul, 2004).

A **valós idejű (real-time) PCR** módszerrel nemcsak a patogén specifikus kimutatása lehetséges, de a vizsgált mintában jelenlévő sejtek koncentrációja is meghatározható, így tehát mind kvalitatív, mind kvantitatív vizsgálatokra alkalmas eljárás. További előnye, hogy segítségével a gének expressziója is vizsgálható. A módszer a hagyományos PCR-től a detektálás módjában tér el; az amplikon kimutatása ebben az esetben egy specifikus próbával történik. A próba kötődésének kimutatására specifikus festékek és flouoroforok alkalmazhatók (Houghton és Cockerill, 2006).

A **mikrochipek** alkalmazása patogének detektálására, illetve virulencia génjeik és génaktivitásuk kimutatására szintén egyre szélesebb körben figyelhető meg. A hordozóhoz rögzített egyszálú DNS oligonukleotid próbákhoz a vizsgált szervezetből kivont nukleinsavat (DNS-t vagy RNS-t)

hibridizálva egyetlen hibridizációs vizsgálatban jelentős számú genetikai tulajdonság vizsgálható (Sanderson és Nichols, 2003).

2.6.7. *Campylobacter* fajok vizsgálatához alkalmazható molekuláris biológiai módszerek

Campylobacter fajok detektálására, azonosítására és tipizálására számos módszert fejlesztettek ki az elmúlt években. A 4. táblázatban néhány módszert és az eljárások során vizsgált célszekvenciákat foglaltam össze.

4. táblázat: *Campylobacter* fajok kimutatására, identifikálására és tipizálására alkalmazható molekuláris biológiai módszerek

Módszer	Célszekvenciák	Referenciák
Kromoszóma makrorestrikciós jellemzés	teljes genomot vizsgáló eljárás	Atabay et al., 1997; Wassenaar és Newell, 2000; Zorman et al., 2006; Poly et al., 2004
RAPD vizsgálat	teljes genomot vizsgáló eljárás	Hilton et al., 1997; Madden et al., 1998; Payne et al., 1999; Misawa et al., 2000; Etras et al., 2004
Génspecifikus PCR	<i>ceuE</i>	Gonzalez et al., 1997
	<i>nap</i> lókuszt	Miller et al., 2007
	16S rRNS gén	Lawson et al., 1997
Multiplex PCR	16S rRNS gén, <i>mapA</i> , <i>ceuE</i>	Denis et al., 1999; Manfreda et al., 2003
PCR-RFLP vizsgálat	<i>flaA</i>	Acik és Cetinkaya, 2006; Alm, 1993b; Ayling et al., 1996; Chen és Stern, 2001; Djordjevic et al., 2007; Etras et al., 2004
	16S rRNS gén	Marshall et al., 1999
	23S rRNS gén	Steinhausserova et al., 2002; Moreno, Y et al, 2002; Kudirkiene et al, 2008
	<i>groEL</i>	Kärenlampi et al., 2004
AFLP	teljes genomot vizsgáló eljárás	Wassenaar és Newell, 2000; Schouls et al., 2003
MLST	háztartási gének	Dingle et al., 2001; Dingle et al., 2005; Djordjevic et al., 2007
Közvetlen gén szekvenálás	<i>flaA</i>	Hiett et al., 2002
Valós idejű PCR	16S rRNS gén, <i>hipO</i> ; <i>cadF</i>	Abu-Halaweh, 2005; Oliveira et al., 2005
Duplex real-time PCR	<i>mapA</i> , <i>ceuE</i>	Best et al, 2003
SA-PCR	<i>flaA</i>	Cloak et al., 2001
Immunomágneses csapda – fluoreszcens PCR	<i>flaA</i> gén, <i>hipO</i>	Liu et al., 2006
DNS alapú microarray	16S rRNS gén, <i>cj0046</i> gén, <i>hipO</i> , 16S-23S rRNS gén; <i>fur</i> , <i>glyA</i> , <i>cdtABC</i> , <i>ceuB-C</i> , <i>fliY</i>	Keramasa et al., 2003; Volokhov et al., 2003

2.7. A vizsgálati eredmények kiértékeléséhez és a módszerek összehasonlításához alkalmazható statisztikai módszerek

A mikrobiológia számos területén a mérési eredmények helyesen csak akkor értékelhetők, ha azokat megfelelő matematikai-statisztikai alapokon nyugvó szemlélettel közelítik. A molekuláris biológiában a nagy mennyiségű adatot tartalmazó adathalmazok interpretálása szintén bonyolult feladat, ez azonban a különböző statisztikai módszerek segítségével megkönnyíthető.

2.7.1. Főkomponens analízis

A különböző összefüggések feltárására, az összefüggéseket leíró modellek meghatározására alkalmazható eljárások között nagy jelentőséggel bírnak a többváltozós módszerek, amelyek a problémák egyfajta rendszerszemléletű megközelítését teszik lehetővé (Szelényi, 2004). A módszer valamennyi vizsgált változót (például mikroba jellemzőket) két vagy három főkomponensben tömöríti össze az információ matematikai értelemben vett minimális vesztesége nélkül. Ezen főkomponensek az adatok jelölésére és virtuális megjelenítésére szolgáló tengelyekként alkalmazhatók. Az eljárás segítségével megjeleníthetők a változók (például jellemzők) közötti kapcsolatok, illetve lehetővé válik a kapott csoportosítás interpretálása is (Oda és Ouchi, 1989). A módszert Dollhopf és munkatársai (2001) baktériumok terminális-RFLP vizsgálattal kapott eredményeinek statisztikai kiértékeléséhez alkalmazták, Oda és Ouchi (1989) élesztőtörzseket csoportosítottak az eljárás segítségével, míg Capece és munkatársai (2005) borból izolált *Hanseniaspora uvarum* törzsekkel kapott vizsgálati eredmények értékelését végezték el a módszerrel.

2.7.2. Klaszteranalízis

A klaszteranalízis egy olyan matematikai módszer, amely egy adathalmazon belül felismeri a természetes és értelmezhető klasztereket. A módszer lényege abban rejlik, hogy a hasonló jellemzőkkel rendelkező adatokat minden előzetes ismeret nélkül csoportokba rendezi. Két alapvető megközelítés létezik az adatok csoportosítására: a partícionálás és a hierarchikus módszer (Todd et al., 2008). Egy meghatározott hasonlósági szint esetén kimutatható és ábrázolható, hogy a megfigyelt egységek közül adott jellemzőik alapján melyek hasonlítanak egymásra a rögzített szinteknél nagyobb mértékben. Számos más statisztikai módszerrel szemben a klaszteranalízis előnye, hogy nem szükséges kezdeti hipotézis felállítása az adatok eloszlásával kapcsolatban és a kapott eredmények értelmezése is egyszerűbb (da Silva Meyer et al., 2004). A klaszteranalízis során

a hasonlóság mértékének meghatározásához gyakran alkalmazott módszer az UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) eljárás, amely egy hierarchikus csoportosítási elven alapuló statisztikai módszer. Az algoritmus megvizsgálja a kialakult hasonlósági mátrix struktúráját, és a csoportokat páronként összehasonlítva szerkeszti meg a dendogramot. Minden lépésnél a két legközelebb eső csoport kombinálásával egy magasabb rendű csoportot alakít ki (van Ooyen, 2001).

Az epidemiológiai vizsgálatok során a klaszteranalízis gyakran alkalmazott módszer a patogének terjedési útvonalának felderítésében. Sauders és munkatársai (2006) például humán liszteriózisok epidemiológiai vizsgálatában alkalmazták hatékonyan az eljárást. Marques és munkatársai (2008) növénypatogén *Pseudomonas* törzsek BOX-PCR eredményeinek értékelése során használták a módszert az izolátumok csoportosítására.

2.7.3. Simpson-féle diverzitás index

A tipizálási módszerek hatékonyságát számos tényező befolyásolja, így a cél mikrobák tipizálhatósága, a reprodukálhatóság, valamint a megkülönböztető (diszkriminációs) képesség. Egy tipizálási eljárás megkülönböztető képessége a módszer azon tulajdonsága, hogy mennyire képes a módszer a nem-rokon törzsek között különbségeket tenni. Ez meghatározható a teszt módszer által kapott típusok számával, valamint ezen típusok relatív gyakoriságával. Az elkülönítés hatékonyságának kifejezésére alkalmazható a diszkriminációs („D”) érték (1. képlet), amely annak a valószínűségén alapszik, hogy a vizsgálandó populációból származó két eltérő törzs különböző csoportba kerül. Ez a valószínűség a Simpson-féle diverzitási indexszel („1-D”) (Simpson, 1949) jellemezhető, amelyet a szerző adott ökológiai élőhelyen található fajok diverzitásának meghatározására fejlesztett ki. Ezt később Hunter és Gaston (1988) élesztőgomba tipizálási módszerek diszkriminációs képességének meghatározására aktualizálta.

$$D = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1) \quad (1. \text{ képlet})$$

ahol: N: a vizsgált izolátumok száma

S: a típusok/csoportok száma

n_j: a j-dik típusba/csoportba tartozó izolátumok száma

A fenti képlet segítségével meghatározható diverzitási index („1-D”) értéke 0 és 1 közé eshet. Egy tipizálási módszer elkülönítő képessége annál jobb, minél közelebb áll ez az érték 1-hez.

Hong és munkatársai (2007) élelmiszerekből, illetve sporadikus megbetegedésekből izolált *Listeria monocytogenes* törzsek makrorestrikciós RFLP vizsgálata során a Simpson-féle diverzitási indexszel jellemezték a különböző populációkat és a kapott ujjlenyomat profilokat. Johnson és munkatársai (2007) az MLST és a PFGE diszkriminációs képességét hasonlították össze *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok esetében a Simpson-féle diverzitási indexek meghatározásával. A módszer tehát jól alkalmazható a molekuláris biológiai tipizálási eljárások elkülönítési tulajdonságának és hatékonyságának jellemzésére.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám fő célkitűzése az volt, hogy az élelmiszer-biztonsági szempontból kiemelt fontosságú baktériumok közül az *Escherichia coli* patogén törzseinek, valamint a termofil kampilobakterek közül a *C. jejuni* és *C. coli* fajok élelmiszerből történő kimutatásához, azonosításához és tipizálásához új molekuláris módszereket fejlesszek ki, valamint a különböző molekuláris módszerek alkalmazhatóságát megvizsgáljam.

A megvalósítandó feladatok és a fő lépések az alábbiak voltak:

1. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős *Escherichia coli* és termofil *Campylobacter* fajok törzseinek izolálása élelmiszerekből.
2. Az izolátumok molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítása és tipizálása
 - a/ az *Escherichia coli* fajba tartozó izolátumok pontos azonosításához, illetve a faj O157:H7 szerotípusú törzseinek kimutatásához duplex PCR módszer kidolgozása
 - b/ az izolált baktériumok kimutatása és azonosítása a kidolgozott PCR-alapú módszer segítségével
 - c/ az izolátumok tipizálása RAPD-PCR eljárással.
3. Szelektív dúsítás hatásának vizsgálata élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős termofil *Campylobacter* (*C. coli* és *C. jejuni*) fajokra
 - a/ a vizsgált törzsek szaporodási görbéinek meghatározása
 - b/ az eltérő fajhoz tartozó törzsek szaporodási képességének meghatározása szelektív dúsítóban történő együttes tenyésztés során.
4. *Campylobacter* izolátumok vizsgálatára alkalmas, különböző PCR-alapú molekuláris biológiai módszerek adaptálása, fejlesztése és alkalmazhatóságának összehasonlítása
 - a/ különböző forrásból származó *Campylobacter* izolátumok azonosítása specifikus primerekkel PCR reakcióban
 - b/ az izolátumok tipizálása különböző PCR-alapú molekuláris módszerekkel
 - c/ a tipizálási eljárások összehasonlítása diszkriminációs képességük alapján.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Baktérium törzsek

A dúsítási vizsgálatok során három különböző angliai farmról izolált, baromfi eredetű *Campylobacter* törzseket (négy *Campylobacter coli* és négy *Campylobacter jejuni* izolátumot) vizsgáltam. A nyolc törzsből kettőt (a J4 és C1 jelű) szelektív dúsítást követően, míg a többi izolátumot közvetlenül a minta szelektív táptalajra történt kioltásával izoláltak. A tanulmányozott izolátumok és tipizálási adataik az 5. táblázatban láthatók.

5. táblázat: A dúsítási vizsgálatban felhasznált baromfi eredetű *Campylobacter* törzsek és tipizálási adataik

Jelölés	Faj	MLST	<i>flaA</i> -RFLP típus	Szerotípus	Fág típus
J1 (2295/D3)	<i>C. jejuni</i>	45	1	27	67
J2 (2350/D2)	<i>C. jejuni</i>	354	2	18	2
J3 (4715/D3)	<i>C. jejuni</i>	791	5	9	44
J4 (8024/E1)	<i>C. jejuni</i>	53	1	ND ^a	ND ^a
C1 (1073/E1)	<i>C. coli</i>	1680	5	56	UT ^b
C2 (1045/D4)	<i>C. coli</i>	860	12	56	44
C3 (4817/D1)	<i>C. coli</i>	ND ^a	5	39	2
C4 (8009/D1)	<i>C. coli</i>	ND ^a	9	ND ^a	ND ^a

^anincs meghatározva, ^bnem tipizálható

A molekuláris biológiai vizsgálatok során különböző eredetű *Escherichia coli* és *Campylobacter* izolátumokkal dolgoztam. A vizsgált SE jelű *Escherichia coli* izolátumok baromfihúsról, valamint baromfihússal, tökehússal és sajttal érintkező felületekről kerültek izolálásra, míg a többi vizsgált *E. coli* törzs elsősorban humán székletmintából származott. A sertés, a szarvasmarha, a tej és a baromfi mintákból származó *Campylobacter* törzseket Dr. Jánosi Szilárd (MgSzH, Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság) bocsátotta rendelkezésemre, a székletmintákból származó *Campylobacter* izolátumokat pedig az Országos Epidemiológiai Központból, Dr. Kiss Rékától kaptam. Az „SVC” kóddal ellátott kampilobaktériumokat baromfi húsról izoláltam. A 6. és a 7. táblázatban foglaltam össze a munkám során alkalmazott *E. coli* és *Campylobacter* típus- és referenciatörzseket, valamint a vizsgált izolátumokat.

6. táblázat: A molekuláris biológiai vizsgálatok során alkalmazott *Escherichia coli* törzsek

Faj	Törzs jelölése	Szerotípus	Származás és eredet
<i>Escherichia coli</i>	ATTC 8739	NS	ATCC ^a , humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	ATCC35150	O157:H7	ATCC, humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12079	O157:H7	NCTC ^b , humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	EC01	NS*	BCE-MBT ^c
<i>Escherichia coli</i>	15V	NS	VSA ^d
<i>Escherichia coli</i>	33VAC/1	NS	VSA
<i>Escherichia coli</i>	33c	NS	VSA
<i>Escherichia coli</i>	393	O26:H-	VSA
<i>Escherichia coli</i>	EF3	O26:H-	ISS ^e , Ref. EPEC F41
<i>Escherichia coli</i>	ED56	O26:H11	ISS, borjú ürülék
<i>Escherichia coli</i>	ED161	O86:H40	ISS, humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	ED172	O103:H2	ISS, Ref. PMK1
<i>Escherichia coli</i>	EF1	O111:H-	ISS, Ref. EPEC StokeW
<i>Escherichia coli</i>	ED82	O111:H-	ISS, humán (HUS)
<i>Escherichia coli</i>	ED142	O111:H-	ISS, humán (HUS)
<i>Escherichia coli</i>	ED226	O113:H21	ISS, humán (HUS)
<i>Escherichia coli</i>	ED238	O121	ISS, humán (HUS)
<i>Escherichia coli</i>	ED33	O139:H1	ISS, sertés ürülék
<i>Escherichia coli</i>	ED173	O145:H-	ISS, humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	ED13	O157:H-	ISS, humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	2156 naz.	O157:H7	VSA
<i>Escherichia coli</i>	380 USA	O157:H7	VSA
<i>Escherichia coli</i>	ED10	O157:H7	ISS, humán széklet
<i>Escherichia coli</i>	62	O157:H7	VSA
<i>Escherichia coli</i>	HN-1	O157:H7	Dr. Hilde Nissen, Matforsk, Norvégia
<i>Escherichia coli</i>	SE/1-1/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/1-2/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/1-3/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/2-1/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/2-2/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/2-3/I	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/4-1/II	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/4-2/II	NS	BCE-MBT, baromfi
<i>Escherichia coli</i>	SE/8-1/II	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/8-2/II	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/13-1/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/13-2/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/13-3/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/14-1/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/14-2/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/14-3/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/15-1/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/15-2/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/15-3/I	NS	BCE-MBT, tökehús
<i>Escherichia coli</i>	SE/23-1/I	NS	BCE-MBT, sajt
<i>Escherichia coli</i>	SE/23-2/I	NS	BCE-MBT, sajt
<i>Escherichia coli</i>	SE/23-3/I	NS	BCE-MBT, sajt

*Szerotípus nincs meghatározva; ^aAmerican Type Culture Collection; ^bNational Collection of Type Cultures; ^cBudapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék; ^dDipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Milano; ^eIstituto Superiore di Sanità, Roma.

7. táblázat: A molekuláris biológiai módszerekkel vizsgált *Campylobacter* törzsek

Faj	Törzs jelölése	Származás/Eredet	Faj	Törzs jelölése	Származás/Eredet
<i>C. coli</i>	HNCMB 200004 ^T	OEK ^a , sertés ürülék	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	CCM 6214 ^T	CCM, szarvasmarha ürülék
<i>C. coli</i>	CCM 7227	CCM ^b , selyemmajom ürülék	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	HNCMB 200006	OEK, humán széklet
<i>C. lari</i>	CCM 4897 ^T	CCM, sirály kloáka	<i>C. upsaliensis</i>	CCUG 14913 ^T	CCUG ^c , kutya ürülék
<i>Campylob. sp.</i>	29045	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	11623/3	Szarvasmarha
<i>Campylob. sp.</i>	31815	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	13120/2	Szarvasmarha
<i>Campylob. sp.</i>	32203	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	14538/2	Szarvasmarha
<i>Campylob. sp.</i>	29077	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	11626	Szarvasmarha
<i>Campylob. sp.</i>	30168	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2248/1	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	31308	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2248/2	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	31981	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2264/1	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	28890	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2264/2	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	28952	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2221/2	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	31098	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2221/1	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	31126	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2219/1	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	31422	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2219/2	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	32118	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	2234/1	Tej
<i>Campylob. sp.</i>	32657	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	14456	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	31411	Humán széklet	<i>Campylob. sp.</i>	18741	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14568	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	13145	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14573	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	13096	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	2236/2	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	15030/3	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14464	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	14591	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14771	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-1	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14575	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-3	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	2236/3	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-4	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	2249/3	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-5	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	2256/3	Sertés	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-6	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	2265/1	Szarvasmarha	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-7	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	14864/1	Szarvasmarha	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-9	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	11601	Szarvasmarha	<i>Campylob. sp.</i>	SVC-11	Baromfi
<i>Campylob. sp.</i>	13144	Szarvasmarha			

^aOrszágos Epidemiológiai Központ, Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteménye; ^bCzech Collection of Microorganisms; ^cCulture Collection, University of Göteborg

4.2. Alkalmazott tápközegek

Campylobacter szelektív agar

Campylobacter Selective Agar Base [Merck 1.02248.0500; Merck 1.02249.0001 szelektív kiegészítővel] 5 % steril defibrinált birkavérrel [Biolab BSB 80250] kiegészítve

mCCD agar (Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar = mCCDA)

mCCD Agar base [Oxoid CM739] szelektív kiegészítővel [Oxoid SR155]

Véres agar

Blood Agar Base No. 2. [Oxoid CM0271B] 5 % steril defibrinált lóvérrel [Oxoid SR0050] kiegészítve

Bolton szelektív dúsító (Merck)

[Merck 1.00068.0500; Merck 1.00069.0001 szelektív kiegészítővel]

Bolton szelektív dúsító (Oxoid)

[Oxoid CM 983; Oxoid SR 0208 szelektív kiegészítővel]

Fluorocult Lauril Szulfát leves

[Merck 1.12588.0500]

Heart Infusion (HI) leves

[Bacto Difco Microbiology 238400]

Maximum Recovery Diluent (MRD)

[Oxoid CM0733B]

4.3. Alkalmazott oldatok

Tris-EDTA (TE) puffer [pH 8]

Tris-HCl 10 mM

Na₂-EDTA 1 mM

Fenol-Kloroform-Izoamilalkohol (PCIA) keverék (pH 8,0)

pufferolt fenol : kloroform : izoamilalkohol 25 : 24 : 1 arányú keveréke

Feltárási oldat DNS izoláláshoz (B-puffer) [pH 8]

TritonX-100	2 % (v/v)
nátrium-dodecil-szulfát (SDS)	1 % (w/v)
NaCl	100 mM
Tris-HCl	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM

10x Tris-Bórsav-EDTA (TBE) puffer

Tris base	10,8 % (w/v)
bórsav	5,5 % (w/v)
Na ₂ -EDTA (0,5 M; pH 8,0)	4 % (v/v)

50x Tris-Ecetsav-EDTA (TAE) puffer

Tris base	24,2 % (w/v)
Ecetsav	5,71 % (v/v)
Na ₂ -EDTA (0,5 M; pH 8,0)	10 % (v/v)

Gradiensjelző gélfesték a DGGE vizsgálatokhoz (DCode Dye Solution)

Brómfenolkék indikátor	0,05 g
Xylene cyanol	0,05 g
1x TAE puffer	10 ml

Frontvonaljelző festék a DGGE és heteroduplex vizsgálatokhoz (2x Gel Loading Dye)

Brómfenolkék indikátor (2 %)	0,25 ml
Xylene cyanol (2 %)	0,25 ml
Glicerín	7 ml
Desztillált víz	2,5 ml

Ninhidrin oldat

3,5 % (w/v) ninhidrin aceton-butanolos (1:1) oldata

Frontvonaljelző festék agaróz gélelektroforézishez

Szacharóz	5 g
EDTA (50 mM, pH 8)	1 ml
Brómfenolkék indikátor	10 mg
SDS (10 %)	10 µl
Desztillált víz	10 ml-ig

Etídium-bromid törzsoldat

Etídium-bromid (10 mg/ml) 96 %-os alkoholban és desztillált vízben (1:1) oldva

4.4. Egyéb anyagok

Agaróz gél

A szükséges mennyiségű agaróz hozzáadása 0,5x TBE oldathoz, majd teljes oldódásig tartó melegítés után gélöntés

Molekula méret markerek (elektroforézishez)

- DNA Molecular Weight Marker VI. (Boehringer Mannheim, Germany) (RAPD-PCR analízishez)
- 100 bázisos marker (New England BioLabs) (PCR analízishez, PCR-RFLP, HMA és DGGE vizsgálatokhoz)

4.5. Módszerek

4.5.1. *Escherichia coli* törzsek izolálása és azonosítása tenyésztésen alapuló módszerekkel

A kimutatáshoz Fluorocult Lauril Szulfát (Merck) levest, mint validált alternatív tápközeget használtam. Steril tamponos mintavételt követően a tamponokat Durham csővel ellátott táplevesekbe helyeztem, majd a Fluorocult Lauril Sulfate levest tartalmazó kémcsöveket 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam. A pozitív csövekből (szaporodás, gázképzés és fluoreszkálás UV fény alatt 0,1 M NaOH hozzáadása után) 1 ml-nyi mennyiségeket a szabványos *E. coli* kimutatással alternatív PetrifilmTM *E. coli*/kóliform (3M) lemezekre oltottam és 37 °C-on újabb 24 órán keresztül inkubáltam. A Petrifilmen gázképzés mellett kék színű telepeket képző izolátumokat TGE agarra oltva, tiszta tenyészeteket készítve vizsgáltam tovább.

4.5.2. *Campylobacter* törzsek kimutatása és izolálása tenyésztésen alapuló módszerekkel

A steril tamponos mintavételt követően a mintavevőket Bolton szelektív dúsító folyadékba (Merck) helyeztem és 37 °C-on 24 órán át inkubáltam anaerob körülmények között. A dúsítást követően a csövekből *Campylobacter* szelektív agarra (Merck) szélesztettem és a lemezeket mikroaerofil körülmények között (Anaerocult C, Merck) 42 °C-on 48 órán át inkubáltam. A szelektív agaron kinőtt telepekből tiszta tenyészeteket készítettem és megerősítés céljából (Gram-festéssel, oxidáz és kataláz próbával) tovább vizsgáltam.

4.5.3. A *Campylobacter* törzsek dúsítási vizsgálata során az izolátumok tenyésztési körülményei

A *Campylobacter* törzsek felélesztése a -80°C-on tárolt gyöngyökről 5 % defibrinált lóvérrel kiegészített véres agarra való oltással történt. A tenyészetek tisztaságának megerősítéséhez latex agglutinációs tesztet (Microscreen® *Campylobacter*, Microgen Bioproducts, Camberley, UK), vékonyréteg kromatográfiás elven működő immunológiai tesztet (VWR Singlepath lateral flow system; Merck, Nottingham, UK), oxidáz próbát, Gram-féle festést és fáziskontraszt mikroszkóppal végrehajtott morfológiai vizsgálatokat végeztem el. A *Campylobacter* izolátumokat a vizsgálatok során mikroaerofil körülmények között tenyésztettem Compact-M anaerob fülkében (Don Whitley, Shipley, UK) a katalizátor eltávolítása után 10 % CO₂-ot, 5 % O₂-t és 85 % N₂-t tartalmazó gázkeverékben. A törzseket korábban MLST, *flaA*-RFLP módszerrel és szerotipizálással vagy fágtypizálással jellemezték (Bull et al., 2006; Allen et al., 2007) (4. táblázat).

4.5.4. *Campylobacter* törzsek szaporodási görbéinek meghatározása

A szaporodási görbék meghatározása során az oltáshoz használt sejttömeg elkészítéséhez 10 ml Heart-Infusion (HI) leveseket beoltottam egy kacsnyi, 48 órás, szintén HI levesben tenyésztett sejtekkel. A tenyészeteket 41,5 °C-on 18 órán keresztül mikroaerofil körülmények között inkubáltam, majd úgy hígítottam a sejteket tartalmazó tápleveseket, hogy 600 nm-en optikai denzitásuk 0,1 legyen. Az így kapott szuszpenziókból tizedelő hígítási sorozatot készítettem HI levesben 10⁻⁵ hígítási fokig. A 10⁰-10⁻³ hígításokból 200 µl-t pipettáztam a mikrotiter lemez celláiba úgy, hogy valamennyi tesztörzs esetében három párhuzamos vizsgálatot végezhessenek el. A lemezt ezután 15 percre mikroaerofil fülkébe helyeztem, majd vazelin segítségével ráragasztottam a tetőt, amelyet még ragasztószalag segítségével is rögzítettem. Az így elkészített mikrotiter lemezt behelyeztem a Bioscreen C (LabSystems, USA) készülékbe és 41,5 °C-on 48 órán keresztül inkubáltam. Az OD értékeket óránként mérte a készülék egy 10 másodperces rázási lépést követően. A kezdeti sejtszám meghatározása véres agarra felületi szélesztéses módszerrel történt.

4.5.5. A *Campylobacter* törzsek dúsítási vizsgálata

A *Campylobacter* izolátumokat véres agarra oltottam, majd 48 óra után egy kacsnyi sejtet FBP kiegészítővel [Oxoid SR84] elkészített HI levesbe oltottam. A 25 ml-es csavaros tetejű üvegekben lévő 10 ml-nyi leveseket 41,5 °C-on 24 órán keresztül inkubáltam mikroaerofil körülmények között (lazán rácsavart tető mellett). Az inkubációs idő letelte után az optikai denzitások értékét 600 nm-en lemértem, majd az újabb 10 ml HI leveseket úgy oltottam, hogy azok OD értéke 0,05 legyen. Újabb 18 órás tenyésztés után Thoma számlálókamra (Weber Scientific International, Hamilton, USA) segítségével meghatároztam a sejtkoncentrációt, valamint lemértem az OD értékeket. Valamennyi törzsből hígítási sorozatot készítettem MRD hígító oldatban, majd a megfelelő hígítási tagból beoltottam a Bolton szelektív dúsítókat (Oxoid) úgy, hogy milliliterenként körülbelül 50 telepképző egység legyen a dúsító folyadékokban. A *C. coli* és *C. jejuni* sejtekkel 16 kombinációban (8. táblázat) a következő arányban oltottam be a leveseket (az első szám a *C. coli*-ra, míg a második a *C. jejuni*-ra utal): (A) 1:99, (B) 10:90, (C) 20:80, (D) 30:70 és (E) 50:50.

8. táblázat: A *Campylobacter coli* és *C. jejuni* törzsek kombinációi a dúsítási vizsgálatok során

Kombinációk	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>	
	Minta	Eredet	Minta	Eredet
C1 – J1	C1/ dúsítás	baromfi vakbél	J1/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C1 – J2	C1/ dúsítás	baromfi vakbél	J2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél
C1 – J3	C1/ dúsítás	baromfi vakbél	J3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C1 – J4	C1/ dúsítás	baromfi vakbél	J4/ dúsítás	baromfi vakbél
C2 – J1	C2/közvetlen kioltás	baromfi vakbél	J1/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C2 – J2	C2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél	J2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél
C2 – J3	C2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél	J3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C2 – J4	C2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél	J4/ dúsítás	baromfi vakbél
C3 – J1	C3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék	J1/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C3 – J2	C3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék	J2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél
C3 – J3	C3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék	J3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C3 – J4	C3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék	J4/ dúsítás	baromfi vakbél
C4 – J1	C4/ közvetlen kioltás	baromfihús	J1/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C4 – J2	C4/ közvetlen kioltás	baromfihús	J2/ közvetlen kioltás	baromfi vakbél
C4 – J3	C4/ közvetlen kioltás	baromfihús	J3/ közvetlen kioltás	baromfi ürülék
C4 – J4	C4/ közvetlen kioltás	baromfihús	J4/ dúsítás	baromfi vakbél

A beoltott Bolton leveseket 41,5 °C-on 48 órán keresztül inkubáltam aerob termosztátban a csavarmenetes kupak erős megszorítása mellett kis rést hagyva a kupak és a folyadék felülete között. A kísérlet során beoltott valódi sejtkoncentrációt felületi szélesztéses módszerrel határoztam meg úgy, hogy a megfelelő hígítási tagból 50 µl mennyiséget oltottam ki véres agar felületére. A Bolton szelektív dúsítók inkubálása után egy kacsnyi (kb. 10 µl) mennyiséget mCCD agar felületére szélesztettem, hogy jól elkülönülő telepeket kapjak, majd a lemezeket 41,5 °C-on 48 órán keresztül

inkubáltam mikroaerofil körülmények között. Az inkubálás után 20 jól elkülönülő telepet választottam ki az agarokról, figyelve arra, hogy eltérő morfológia esetén különböző telepek is izolálásra kerüljenek. A telepek azonosítása előtt valamennyi izolátumot újra kioltottam mCCD agarra, hogy a sejtek megfelelő mennyiségben álljanak rendelkezésemre a további vizsgálat során. A *C. jejuni* törzsek *C. coli* törzsektől való elkülönítéséhez hippurát hidrolízis vizsgálatot alkalmaztam.

4.5.6. Hippurát hidrolízis

A törzsek hippurát hidrolizáló képességének vizsgálatához a Hwang és Ederer (1975) által leírt módszer módosítását alkalmaztam. A vizsgálatokat mikrotiter lemezekben végeztem el úgy, hogy 100 µl 1 % (w/v) Na-hippurát oldatot juttattam valamennyi cellába, majd az mCCD agaron 48 órán át 41,5 °C-on tenyésztett sejtekből egy kacsnyit adtam az oldathoz. A lemezek 37 °C-on 4 órán át történő inkubálása után egy cseppnyi (kb. 10 µl) 3,5 % (w/v) ninhidrin oldatot adtam valamennyi vizsgált mintához, majd az eredmények leolvasása előtt egy újabb 37 °C-os 15 perces inkubálás következett.

4.5.7. Genomiális DNS izolálása PCR alapú molekuláris módszerekhez

A baktérium sejtekből történő DNS kivonás a Hoffman és Winston (1987) által leírt módszerrel történt. A 24 órás tenyészetekből egy nagy kacsnyit 1 ml steril desztillált vizet tartalmazó Eppendorf csőbe felfuszpendáltam. A sejtek 5 percig tartó 14000 rpm-en történő centrifugálásos ülepítése után a felülúszót leöntöttem, majd 200 µl sejtfeltárási oldatot (B-puffert), körülbelül 0,3 gramm üveggyöngyöt (0,4-0,6 mm, Sartorius) és 200 µl PCIA oldatot mértem a sejtekre, majd 3 percen keresztül vortexszel kevertem. Ezután 200 µl TE puffert adtam a mintákhoz, röviden kevertem, majd 5 percig centrifugáltam. A nukleinsavat tartalmazó vizes fázist egy új, 800 µl 96 %-os etanolt tartalmazó Eppendorf csőbe pipettáztam és fagyasztoóban 10 percig állni hagytam. A csapadékot centrifugálással ülepítettem, 50 µl TE pufferben szuszpendáltam, majd 3 µl RNáz oldatot (10 mg/ml) mértem hozzá. A mintákat 60 °C-on 30 percen keresztül inkubáltam, majd 100 µl etanol hozzáadása után rövid időre ismét fagyasztoóba tettem. Ismételt centrifugálást követően a felülúszó eltávolítása után a DNS-t vákuum centrifugában (DNA mini, Heto) szárítottam, 30 µl TE pufferben felfuszpendáltam, és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

4.5.8. Specifikus PCR reakciók alkalmazása

A specifikus polimeráz láncreakciók során a 9. táblázatban felsorolt primerek (indító szekvenciák) kerültek alkalmazásra.

4.5.8.1. *Escherichia coli* törzsek vizsgálata duplex PCR segítségével

A duplex PCR reakció során egy faj- és egy szerotípus specifikus primer párt alkalmaztam. Az *Escherichia coli* fajra jellemző *malB* promotor mintegy 590 bázispár hosszúságú szekvenciáját az Eco-1 és Eco-2 primereket alkalmazva szaporítottam fel, míg az O157:H7 szerotípusra specifikus indító szekvenciákkal (O157-3 és O157-4) az enterohemolizin gén egy rövidebb részletét sokszorozítottam fel (9. táblázat).

9. táblázat: A specifikus PCR reakciókban alkalmazott oligonukleotid primerek

Faj/törzs	Célgén	Primer	PCR primer szekvenciája (5' – 3')	Méret (bp)	Referencia
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>flaA</i> ¹	CF02 CF03	AAGCAAGAAGTGTTCCTCAAGTTT GCTCAAAGTGGTTCTTATGC ² NATGG	180-200	Wegmüller et al., 1993
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>flaA</i> ¹	CF03 CF04	GCTCAAAGTGGTTCTTATGC ² NATGG GCTGCGGAGTTTCATTCTAAGACC	340-380	Wegmüller et al., 1993
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>flaA</i> ¹	CF02 GC-CF03	AAGCAAGAAGTGTTCCTCAAGTTT *GCTCAAAGTGGTTCTTATGC ² NATGG	220-240	Wegmüller et al., 1993
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>flaA</i> ¹	CA-F CA-R	GGATTTTCGTATTAAACACAAATGGTGC CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG	1700	Nachamkin et al., 1996
<i>Campylobacter coli</i> és <i>C. jejuni</i>	<i>rrs</i> ²	CCCJ 609 CCCJ 1442	AATCTAATGGCTTAACCATTA GTAAGTAGTTTAGTATTCGG	854	Linton et al., 1997
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hip</i> ³	HIP 400F HIP 1134R	GAAGAGGGTTTGGGTGGT AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG	735	Linton et al., 1997
<i>Campylobacter coli</i>	<i>asp</i> ⁴	CC 18F CC 519R	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	500	Linton et al., 1997
<i>Escherichia coli</i>	<i>malB</i> ⁵	Eco-1 Eco-2	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA CACACGCTGACGCTGACCA	585	Wang et al., 1997
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>hlyA</i> ⁶	O157-3 O157-4	GTAGGGAAGCGAACAGAG AAGCTCCGTGTGCCTGAA	361	Wang et al., 1997
Legtöbb baktérium	<i>rrs</i> ²	27 f 1492 r	AGAGTTTGAT ⁷ YMTGGCTCAG GGTTACCTTGTACGACTT	1467	Maiwald, 2004

¹ flagellin gén, ² 16S rRNS gén, ³ hippurikáz (benzoyl-glycine amidohydrolase) gén, ⁴ aszpartokináz gén, ⁵ maltóz indukálható porint kódoló gén, ⁶ hemolizin gén, ⁷ *GC kapocs (5'-CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCGAGGGGGGC-3')

A reakció elegy (25 µl) az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x DNS-polimeráz puffer; 1,25 mM MgCl₂; 0,1 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 0,25 µM az egyes primerekből; 0,6 U *Taq* DNS-polimeráz és 1 µl templát DNS. A PCR reakció lépései az alábbiak voltak: kezdő denaturálás 94 °C-on 4 percig, majd 35 cikluson keresztül 94 °C 10 másodpercig, 55 °C 10 másodpercig és 74 °C 35 másodpercig. A végső lánchosszabbítás 74 °C-on 2 percig, majd 45 °C-on 2 másodpercig tartott. A felszaporítást követően a fragmentumok kimutatását agaróz gélelektroforézissel végeztem el.

4.5.8.2. *Campylobacter* izolátumok azonosítása specifikus primerpárok segítségével

A *Campylobacter coli* és *C. jejuni* fajba tartozó izolátumok kimutatásához a 16S rRNS (*rrs*) gén egy olyan szakaszát szaporítottam fel a CCCJ jelű primer pár segítségével, amely különbözik a

többi *Campylobacter* faj ezen génjének szekvenciájától, tehát csak a fent említett két faj kimutatására alkalmazható (Linton et al., 1997). A *Campylobacter jejuni* izolátumok kimutatásához a HIP jelű primereket használtam, amelyek a hippurikáz gén egy adott szakaszát sokszorozították fel. Ez a gén hiányzik a nem-*jejuni* kampilobaktereiből, így csak erre a fajra specifikus. A *C. coli* törzsek kimutatásához használt CC-18F és CC-519R primer pár az aszpartokináz gén egy rövidebb szekvenciájának felszaporítását tette lehetővé. A PCR reakciókat 25 µl végtérfogatban végeztem, amely összetétele a következő volt: 1x DNS-polimeráz puffer; 1,25 mM MgCl₂; 0,1 mM dNTP; 0,25 µM az egyes primerekből; 0,6 U *Taq*-polimeráz és 1 µl templát DNS. A polimeráz láncreakció lépései az alábbiak voltak: kezdő denaturálás 94 °C-on 5 percig, majd 30 cikluson keresztül denaturálás 94 °C-on 1 percig, primerkötés a primer párra specifikus hőmérsékleten (10. táblázat) 1 percig, és lánchosszabbítás 72 °C-on 1 percig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on 3 percig történt.

10. táblázat: A *Campylobacter* izolátumok azonosításához használt primer párok kötődési hőmérséklete

Azonosítható faj/fajok	Primer pár	Primerkötődés hőmérséklete
<i>Campylobacter coli</i> és <i>C. jejuni</i>	CCCJ 609-CCCJ 1442	58°C
<i>Campylobacter jejuni</i>	HIP 400F-HIP 1134R	66°C
<i>Campylobacter coli</i>	CC 18F-CC 519R	60°C

4.5.9. *Escherichia coli* izolátumok RAPD-PCR analízise

A RAPD-PCR reakciók során a primerek kötődési hőmérséklete az M13 miniszatellit kivételével 37 °C volt; az M13 esetében 40 °C-on történt a primerkötés. A PCR reakciókat 25 µl végtérfogatban végeztem a következő összetétellel: 1x DNS-polimeráz puffer; 1,25 mM MgCl₂; 0,3 mM dNTP; 10 µM a RAPD primerekből; 0,6 U *Taq* DNS-polimeráz és 1 µl templát DNS. A felszaporítás az alábbi paraméterek alapján történt: kezdő denaturálás 95 °C-on 5 percig, majd 35 cikluson keresztül 95 °C 30 másodpercig, 37 °C vagy 40 °C 30 másodpercig, végül 72 °C másfél percig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig tartott. Az alkalmazott indító szekvenciákat a 11. táblázatban foglaltam össze.

4.5.10. *Campylobacter* izolátumok RAPD-PCR módszerrel történő tipizálása

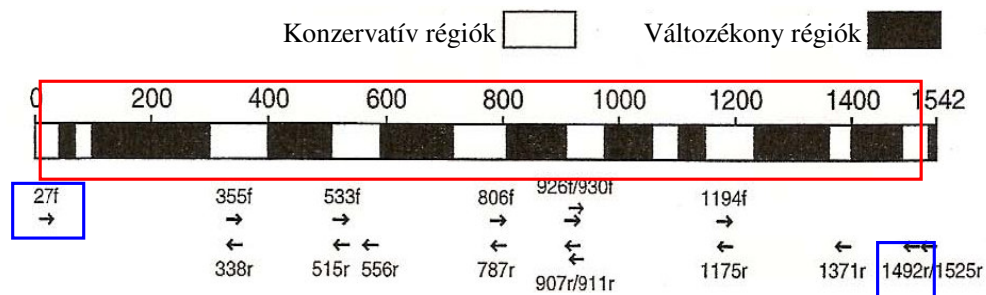
A *Campylobacter* izolátumok tipizálása során rövid oligonukleotid primereket alkalmaztam, amelyek szekvenciáját és optimális kötődési hőmérsékletét a 11. táblázat tartalmazza. A PCR reakciómix összetétele, valamint a láncreakció paraméterei azonosak voltak a 4.5.9. pontban leírtakkal.

11. táblázat: Az *E. coli* és *Campylobacter* izolátumok RAPD-PCR analíziséhez alkalmazott primerek szekvenciái és optimális kötési hőmérsékletük

Primerek	Szekvencia (5' → 3')	Optimális kapcsolódási hőmérséklet (T _{opt})
<i>E. coli</i> izolátumok vizsgálatához alkalmazott RAPD primerek		
OPE 1	CCCAAGGTCC	37 °C
OPE 6	AAGACCCCTC	37 °C
OPE 8	TCACCACGGT	37 °C
OPE 15	ACGCACAACC	37 °C
OPE 18	GGA CTGCAGA	37 °C
OPA 4	AATCGGGCTG	37 °C
OPA 5	AGGGGTCTTG	37 °C
OPA 12	TCGGCGATAG	37 °C
OPA 16	AGCCAGCGAA	37 °C
OPA 19	CAAACGTCGG	37 °C
M13	GAGGGTGGNGGNTCT	40 °C
<i>Campylobacter</i> izolátumok vizsgálatához alkalmazott RAPD primerek		
P272	AGCGGGCCAA	37 °C
OPE 15	ACGCACAACC	37 °C
OPE 18	GGA CTGCAGA	37 °C
M13	GAGGGTGGNGGNTCT	40 °C

4.5.11. *Campylobacter* izolátumok rDNS-RFLP vizsgálata

A 16S rRNS-t kódoló rDNS gén mintegy 1400 bázispár hosszúságú szakaszát a 27f-1492r primerpár (9 táblázat) segítségével szaporítottam fel. A primerek kapcsolódási helyei a génen belül a 3. ábrán láthatók.



3. ábra: A bakteriális 16S rRNS gén konzervatív és variábilis régiói és a különböző PCR primerek kötődési helyei (Maiwald, 2004)

A PCR reakciómix (25 µl) az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x DNS-polimeráz puffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,25 µM mindkét indító szekvenciából, 0,6 µl *Taq* DNS-polimeráz és 1 µl templát DNS. A láncreakció lépései az alábbiak voltak: 95 °C-on 4 percig tartó elődenaturálást követően 35 cikluson keresztül denaturálás 94 °C-on 30 másodpercig, primerkötődés 58 °C-on 60 másodpercig, majd a lánchosszabbítás 72 °C-on 60 másodpercig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on történt 1 percig. A felszaporított rDNS szekvenciák hasítását négy különböző restriktációs

enzimmel (12. táblázat) végeztem el a gyártók által megadott körülmények között (*AluI* és *RsaI* - Fermentas, *MspI* és *HaeIII* – Promega).

12. táblázat: Az amplifikált rDNS hasításához alkalmazott restrikciós endonukleázok és jellemzőik

Enzim	Specifikus felismerési és hasítási hely*	Optimális működési hőmérséklet
<i>AluI</i>	AG↓CT TC↑GA	37 °C
<i>RsaI</i>	GT↓AC CA↑TG	37 °C
<i>MspI</i>	C↓CGG GGC↑C	37 °C
<i>HaeIII</i>	GG↓CC CC↑GG	37 °C

* 5'-3' irányban

A reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 1x enzimpuffer, 3U restrikciós endonukleáz, 2 µl PCR termék, valamint a *HaeIII* és *MspI* enzimek esetén 0,1 µl BSA (10 mg/ml). A 10 µl-es végtér fogat kialakítása steril bidesztillált vízzel történt.

4.5.12. *Campylobacter* izolátumok *flaA*-RFLP vizsgálata

Az RFLP vizsgálat során a flagellin A fehérjét kódoló flagellin gént (*flaA*) a CA-F és CA-R specifikus primerpárt felhasználva szaporítottam fel (9. táblázat). A reakciómix (25 µl) az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x DNS-polimeráz puffer, 1,25 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,25 µM mindkét indító szekvenciából, 0,6 U *Taq* DNS-polimeráz és 1 µl templát DNS. A PCR reakció lépései az alábbiak voltak: kezdő denaturálás 94 °C-on 1 percig, majd 35 cikluson keresztül denaturálás 94 °C-on 15 másodpercig, primerkötés 55 °C-on 45 másodpercig és lánchosszabbítás 72 °C-on 1 perc 45 másodpercig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig tartott. A DNS darabok enzimes hasítását *DdeI*, *HhaI* és *AluI* restrikciós endonukleázokkal (13. táblázat) végeztem el a gyártó (Rosch) által megadott utasítás szerint, 4 órás inkubálással.

13. táblázat: A *flaA*-RFLP analízis során alkalmazott restrikciós endonukleázok hasítási helyei és optimális működési hőmérsékleteik

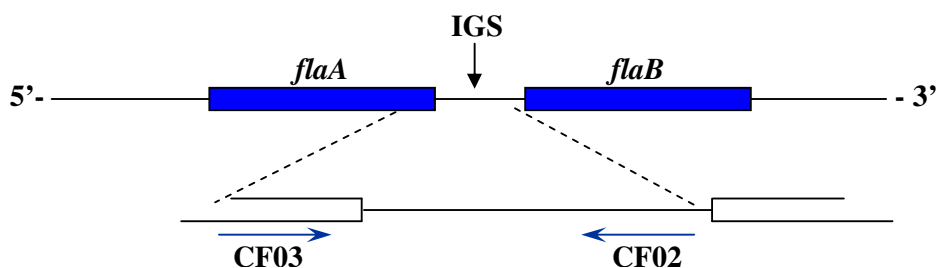
Enzim	Specifikus felismerési és hasítási hely*	Optimális működési hőmérséklet
<i>DdeI</i>	C↓TNAG GANT↑C	37 °C
<i>HhaI</i>	GCG↓C C↑GCG	37 °C
<i>AluI</i>	AG↓CT TC↑GA	37 °C

* 5'-3' irányban

Az enzimes hasításhoz használt reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 1x tömény enzimpuffer, 3 U restrikciós endonukleáz, 3 µl felszaporított DNS és steril bidesztillált víz a 10 µl végtérfogat kialakításához.

4.5.13. *Campylobacter* izolátumok merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézissel (DGGE) történő vizsgálata

A DGGE vizsgálat során a *flaA* és *flaB* gének közötti szekvenciát szaporítottam fel a CF02 és a GC-CF03 primerek (9. táblázat) segítségével (4. ábra). A reakciómix (25 µl) az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x DNS-polimeráz puffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,25 µM mindkét indító szekvenciából, 0,6 U *Taq* DNS-polimeráz és 1 µl templát DNS.



4. ábra: A DGGE analízis során vizsgált DNS szakasz és a felszaporításához használt primerek (IGS: intergénikus szekvencia)

A PCR reakció körülményei a következők voltak: 94 °C-on 2 percig tartó elődenaturálást követően 28 cikluson keresztül denaturálás 94 °C-on 30 másodpercig, primerkötődés 56 °C-on 60 másodpercig, majd a lánchosszabbítás 72 °C-on 30 másodpercig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on történt 1 percig. Az amplikonok elektroforetikus vizsgálata urea és formamid segítségével kialakított denaturáló gradiens mellett történt *DCode Mutation Detection System* (BioRad) készülékkel.

Az optimális denaturáló gradiens meghatározásához 0,75 mm vastagságú, 7,5 x 10 cm-es (duál), 8 %-os poliakrilamid géleket készítettem először 0 % és 100 %, később 0 % és 40 % gradiens tartományokat kialakítva. Az urea és formamid segítségével előállítható különböző gradienseket az eltérő koncentrációjú (0 % és a 100 %) denaturáló oldatokból (14-15. táblázat) a 16. táblázatban feltüntetett keverési arányokkal készítettem el. A gélek elkészítéséhez a BioRad *DCode Universal Mutation Detection System* készülék gradiensöntőjét használtam. A nagyobb koncentráció-gradienshez a gélöntést megelőzően gradiensjelző gélfestéket adtam, amelynek következtében a gélben kialakult gradiens láthatóvá vált. A gél egyetlen nagyméretű zsebébe 100 µl, GC-kapcsos primerrel felszaporított DNS-t és 100 µl futtató festéket juttattam, majd az elektroforézist 1x

töménységű TAE pufferben végeztem állandó, 56°C-os hőmérsékleten 130 V-os állandó feszültség mellett 2 órán keresztül. Az elektroforézist követően a géleket etidium-bromidot (0,5 mg/ml) tartalmazó pufferben festettem 5 percig, majd desztillált vízben mostam 15 percig. A DNS-eket ezután UV transzilluminátorral megvilágítva tettem láthatóvá.

14. táblázat: A 0 %-os denaturáló oldat összetétele eltérő koncentrációjú akrilamid gélek esetén

Komponensek	6% gél	8% gél	10% gél	12% gél
30% Acrylamide/Bis	20 ml	26,67 ml	33,3 ml	40 ml
50x TAE puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
dH ₂ O	100 ml-re	100 ml-re	100 ml-re	100 ml-re

15. táblázat: A 100 %-os denaturáló oldat összetétele eltérő koncentrációjú akrilamid gélek esetén

Komponensek	6% gél	8% gél	10% gél	12% gél
30% Acrylamide/Bis	20 ml	26,67 ml	33,3 ml	40 ml
50x TAE puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Formamid	40 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Urea	42 g	42 g	42 g	42 g
dH ₂ O	100 ml-re	100 ml-re	100 ml-re	100 ml-re

16. táblázat: A 0 % és 40 % denaturáló gradienst tartalmazó, 8 %-os poliakrilamid gél elkészítéséhez alkalmazott keverési arányok.

Komponensek	8 % poliakrilamid gél	
	0 %	40 %
6% PAA – 0 % DK	2,25 ml	1,35 ml
10 % PAA – 100 % DK	-	0,9 ml
6% PAA – 0 % DK	2,25 ml	1,35 ml
10 % PAA – 100 % DK	-	0,9 ml
TEMED	4 µl	4 µl
Ammónium-perszulfát	21 µl	21 µl

4.5.14. *Campylobacter* izolátumok párhuzamos denaturáló gradiens gélelektroforézissel történő vizsgálata

A párhuzamos DGGE vizsgálatok során 16x16 cm-es, 1 mm vastagságú, 20 % és 40 % közötti denaturáló gradiensű 8 %-os poliakrilamid géleket készítettem a 17. táblázatban feltüntetett keverési arányok alapján. Ennél az eljárásnál a zsebek kialakítására szolgáló fészűt töltőgélbe ágyaztam, amely nem tartalmazott denaturáló komponenst, így segítve elő a DNS minták gélben való elrendeződését egy rövid, alacsony feszültségen elvégzett előfuttatás során. Az előzőleg PCR-rel felszaporított DNS mintákból 15 µl-t vittem fel a gél zsebeibe úgy, hogy előzőleg 15 µl futtató festéket kevertem hozzájuk. A vertikális elektroforézis 1x TAE pufferben történt 56°C-on az alábbiak szerint: 20 V feszültségen 15 percig (előfuttatás), majd 200 Volton 3 órán át. A géleket ezután etidium-bromidot (0,5 mg/ml) tartalmazó 1x TAE pufferben festettem 5 percig, majd 15

percig mostam desztillált vízben. A gélek DNS mintázata UV transzilluminátor segítségével vált láthatóvá.

17. táblázat: A 20 és 40 % denaturáló gradienst tartalmazó 8 %-os poliakrilamid gél elkészítéséhez alkalmazott keverési arányok párhuzamos DGGE esetén

Komponensek	8 % PAA		8 % töltőgél
	20 % DK	40 % DK	
6 % PAA – 0 % DK	4,8 ml	3,6 ml	2,5 ml
6 % PAA – 100 % DK	1,2 ml	2,4 ml	-
10 % PAA – 0 % DK	4,8 ml	3,6 ml	2,5 ml
10 % PAA – 100 % DK	1,2 ml	2,4 ml	-
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl
Ammónium-perszulfát	50 µl	50 µl	22 µl

4.5.15. Heteroduplex mobilitási vizsgálat (HMA)

A heteroduplex vizsgálat során 20x20 cm-es, 1 mm vastagságú, 6 %-os nem-denaturáló poliakrilamid géleket készítettem a 18. táblázatban feltüntetett komponensekből a megadott mennyiségeket felhasználva.

18. táblázat: A heteroduplex analízis során alkalmazott 6 %-os poliakrilamid gél elkészítéséhez szükséges komponensek és mennyiségeik

6 %-os poliakrilamid gél	
30%-os akrilamid oldat	8 ml
10x TBE puffer	4 ml
TEMED	40 µl
10% ammónium-perszulfát	400 µl
1% glicerol	0,46 ml
desztillált víz (40 ml-re)	27,1 ml

A heteroduplexek képzéséhez előzőleg a CF02-CF03 primerpárral (9. táblázat) felszaporítottam a flagellin gén intergénikus szekvenciájának egy részét a 4.5.13. pontban megadottak szerint, majd a mintaelőkészítés során 3 µl felszaporított DNS mintát összekevertem 3 µl típus/referenciatorzsból származó felszaporított DNS-sel, majd PCR készülékben 95 °C-on 5 percig történt a kétszálú DNS-ek denaturálása. A hibridizálás, illetve a renaturálás 15 percen keresztül 55 °C-on zajlott, majd a mintákat szobahőmérsékleten hagytam lassan lehűlni és végül jégbe helyeztem. Az így előkészített mintákhoz azonos mennyiségű (6 µl) futtató festéket adtam és 20 V-on 10 percig, majd 160 Volton 3 órán át 1x TBE pufferben történt a vertikális gélelektroforézis. A DNS mintázatokat etidium-bromidos (0,5 mg/ml) festés és desztillált vizes öblítés után UV transzilluminátorral tettem láthatóvá.

4.5.16. Gélelektroforézis

A PCR módszerrel felszaporított, a RAPD analízissel kapott, illetve a restrikciós hasítással előállított fragmentumok kimutatása és elválasztása agaróz gélelektroforézissel történt. A PCR termékek kimutatásához 1 % -os, míg a különböző méretű fragmentumok egymástól való elválasztásához 1,5 %-os agaróz géleket készítettem. Az elektroforézis 120 V feszültségen, 60 mA áramerősség mellett folyt. A gélek előhívása és archiválása GelDoc1000 (BioRad) gél dokumentációs rendszerrel történt, míg a mintázatok kiértékeléséhez a GelCompare II (Applied Maths) szoftvert használtam.

4.5.17. *Campylobacter* izolátumok *flaA-flaB* intergénikus szekvenciájának bázissorrend meghatározása

A vizsgált izolátumok *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szekvenciájának nukleotidsorrend meghatározásához a CF03-CF04 (9. táblázat) primer párral felszaporítottam a 4.5.13. pontban leírtak szerint egy körülbelül 340 bázispár hosszúságú DNS darabot. Az amplikonok tisztításához PCR Clean Up System (VIOGENE) DNS/RNS extrakciós kitet használtam. A szekvenálás egy irányból, a reverz (CF04) primerrel történt. Az elektroferogramok kiértékeléséhez és a szekvenciák összerendezéséhez a Mega4 szoftvert alkalmaztam, míg a filogenetikai fa elkészítéséhez a ClustalX 1.81 szoftvert használtam.

4.5.18. Statisztikai módszerek a vizsgálati eredmények kiértékeléséhez

Disszertációmban Student-féle t-tesztet (Microsoft Excel), főkomponens analízist (UNSCRAMBLE szoftver), klaszteranalízist (GelCompare II szoftver), valamint Simpson-féle diverzitás index meghatározást (2.7.3. pontban leírtak szerint) alkalmaztam a vizsgálati eredmények kiértékeléséhez.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

5.1. *Escherichia coli* és *Campylobacter* törzsek izolálása élelmiszerekből

Vizsgálataim során feladatul tűztem ki különböző élelmiszerekből és azokkal érintkező felületekről élelmiszer-biztonsági szempontból fontos baktériumok gyűjtését és további PCR alapú vizsgálatát. Az eltérő mintavételi pontokon termofil *Campylobacter* fajok és *Escherichia coli* előfordulásának vizsgálatát végeztem hagyományos tenyésztésen alapuló módszerekkel, a 4.5.1. és 4.5.2 pontokban leírtak szerint. A mintavételi pontokat és a kimutatás eredményeit a 19. táblázat foglalja össze. Az *E. coli* fajba tartozó, valamint termofil kampilobakternek feltételezett izolátumok több esetben is detektálhatóak voltak. *E. coli* izolátumokat csirkebőrrel, továbbá baromfi hússal, sajttal és töke hússal érintkező felületekről sikerült gyűjteni, míg feltételezetten termofil kampilobaktereket baromfiról és a baromfi termékekkel érintkező felületeken kívül sajttal és hidegkonyhai készítményekkel (elsősorban salátákkal) szennyezett felületekről lehetett izolálni.

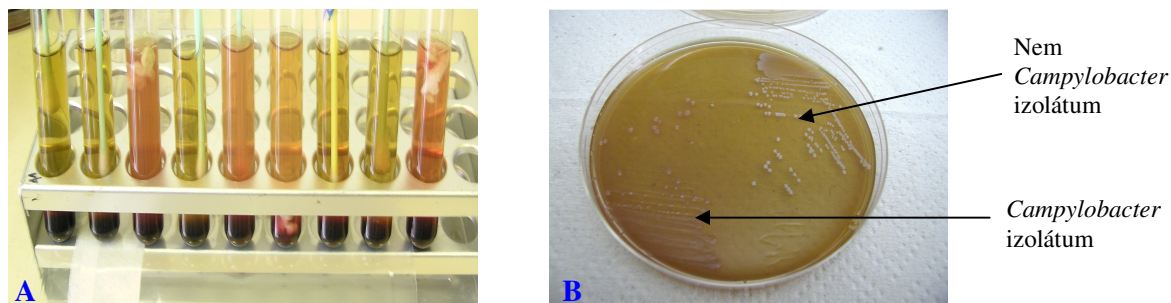
19. táblázat: A baktériumok izolálása során vizsgált élelmiszer minták és felületek, valamint az ezekről kimutatott baktérium előfordulása

Mintavételi helyek	<i>E. coli</i>	termofil <i>Campylobacter</i> törzsek
Baromfi műanyag vágódeszka	+	+
Baromfi fém pult	Nd.	+
Baromfi mérleg (gombok)	-	Nd.
Csirke bőr szárnyról	-	+
Csirke farhát bőr	-	+
Csirkecomb bőr	+	+
Egész csirke bőrfelülete	-	+
Grillszirke műanyag deszka	-	-
Sajt fém pult	+	+
Sajt műanyag deszka	Nd.	-
Sajtszeletelő	Nd.	-
Hidegkonyha fém pult	-	+
Felvágott szeletelő	Nd.	-
Felvágott fém pult	-	-
Felvágott részlegen a csempe	-	-
Tőkehús műanyag vágódeszka	+	-
Tőkehús fa vágódeszka	+	-
Tőkehúsvágó kés	Nd.	-
Tőkehús fém pult	Nd.	-
Tőkehús mérleg	+	-
Saláta műanyag vágódeszka	Nd.	-
Saláta centrifuga	Nd.	-
Saláta fém pult	Nd.	-

Jelölések: Nd.: nem detektálható (mintavétel után nem kimutatható)
 -: nem történt mintavétel
 +: detektálható (mintavétel után kimutatható)

A különböző mintavételi helyekről összesen 22 *E. coli* izolátumot (6. táblázat, SE jelzésű izolátumok) és néhány nem-*Campylobacter* törzs mellett nyolc *Campylobacter* izolátumot (7. táblázat, SVC jelzésű törzsek) gyűjtöttem, amelyeket a későbbiekben a molekuláris identifikálási és tipizálási munkákhoz használtam fel.

Az 5. ábrán a kampilobakterek kimutatása során a szelektív dúsítóból a szelektív táptalajra kioltott mintákra látható példa.



5. ábra: A *Campylobacter* fajok dúsításához használt Bolton levesek (A) és az ezekből *Campylobacter* szelektív táptalajon kinőtt telepek közötti különbségek (B).

5.2. *Escherichia coli* törzsek molekuláris azonosítása és tipizálása

5.2.1. *Escherichia coli* izolátumok vizsgálata duplex PCR módszerrel

Az *Escherichia coli* fajba tartozó törzsek pontos azonosításához, valamint a faj O157:H7 szerotípusú izolátumainak kimutatásához duplex PCR módszert dolgoztam ki. Az egy lépésben történő detektáláshoz és identifikáláshoz a PCR reakció során Wang és munkatársai (1997) által közölt két különböző primer párt alkalmaztam egy reakcióban, amelyek közül az egyik az *Escherichia coli* fajra, míg a másik indító szekvencia pár a faj O157:H7 szerotípusára specifikus. Előzőleg megvizsgáltam a kétféle PCR reakciónak duplex rendszerben való alkalmazhatóságát a primer párok T_m értékeinek, illetve a primerek esetleges hibridizációs képességének szempontjából. Mind a négy primer közel azonos olvadási hőmérséklettel rendelkezett, hajtúhurokot nem alakítottak ki és nem képeztek egymással hetero-dimereket sem, így alkalmasnak bizonyultak egy rendszerben történő alkalmazásra. A duplex PCR eljárás kifejlesztése céljából 23 *Escherichia coli* törzsszel (20. táblázat) teszteltem a módszert, amelynek első lépéseként a fajra specifikus Eco1/Eco2 primer párral, és a szerotípusra specifikus primerekkel (O157-3 és O157-4) (9. táblázat) szimplex PCR

során amplifikáltam az izolátumokból nyert DNS mintákat. A következő lépésben a két primer párt ugyanabban a reakcióban, azonos koncentrációban (0,25 µM) alkalmaztam.

20. táblázat: A tesztörzsek *malB* és a *hlyA* génjére vonatkozó szimplex és duplex PCR-es vizsgálatának eredményei

Kód	Szerotípus	Szimplex PCR		Duplex PCR*	
		<i>malB</i>	<i>hlyA</i>	<i>malB</i>	<i>hlyA</i>
15V	NS	+	-	+	-
ED172	O103:H2	+	+	((+))	+
EF1	O111:H ⁻	+	+	+	+
ED82	O111:H ⁻	+	+	((+))	+
ED142	O111:H ⁻	+	-	+	-
ED226	O113:H21	+	+	((+))	+
ED238	O121	+	-	+	-
ED33	O139:H1	+	-	+	-
ED173	O145:H ⁻	+	-	+	-
ED13	O157:H ⁻	+	+	+	+
NCTC 12079	O157:H7	+	+	+	+
2156 naz.	O157:H7	+	+	+	+
380 USA	O157:H7	+	+	+	+
ED10	O157:H7	+	+	+	+
62	O157:H7	+	+	+	+
33VAC/1	NS	+	+	+	+
ATCC 35150	O157:H7	+	+	+	+
33c	NS	+	-	+	-
EF3	O26:H ⁻	+	-	+	-
ED56	O26:H11	+	+	((+))	+
ED161	O86:H40	+	-	+	-
HN-1 (avirulens)	O157:H7	+	+	+	+
ATCC 8739	-	+	-	+	-

NS: nem szerotipizált; H⁻: H antigén hiányzik

A szimplex és a duplex reakciók során kapott eredményekből (20. táblázat) jól látható, hogy valamennyi, korábban szerotipizálással az O157:H7 szerotípusba sorolt hat törzs mindkét PCR reakcióban képzett amplikonokat. Az agaróz gélelektroforézist követően a fajra specifikus primerekkel körülbelül 580-590 bázispár nagyságú amplikonokat kaptam eredményeképpen, míg az O157:H7 szerotípusra tervezett primerekkel egy körülbelül 370 bázispár nagyságú termék felszaporítása vált lehetővé, amely méretek megegyeztek a Wang és munkatársai (1997) által közölt amplikon méretekkel. Hasonló eredmény volt megfigyelhető az avirulens *E. coli* O157:H7, az O157:H⁻, egy O111:H⁻, valamint egy nem szerotipizált törzs esetében is. A 20. táblázatban összefoglalt eredményekből azonban az is kitűnik, hogy négy vizsgált törzs esetében (szürkével kiemelve) eltérő eredményeket kaptam a szimplex és a duplex PCR során; az ED172, ED82, ED226 és ED56 törzs a duplex reakcióban csak nagyon gyenge jelet adott a fajspecifikus primer párral, míg a szerotípusra specifikus primerekkel megfelelő méretű és erősségű jeleket kaptam, ezért szükség volt a duplex módszer optimalizálására. Első lépésként különböző koncentrációkban alkalmaztam az

egyes primer párokat a PCR reakcióban. A fent említett négy izolátum, valamint két O157:H7 szerotípusú törzs és egy, korábban csak a *malB* génre specifikus primerekkel amplifikálódott izolátummal végeztem el a további vizsgálatokat, amelyek eredményeit a 21. táblázatban foglaltam össze.

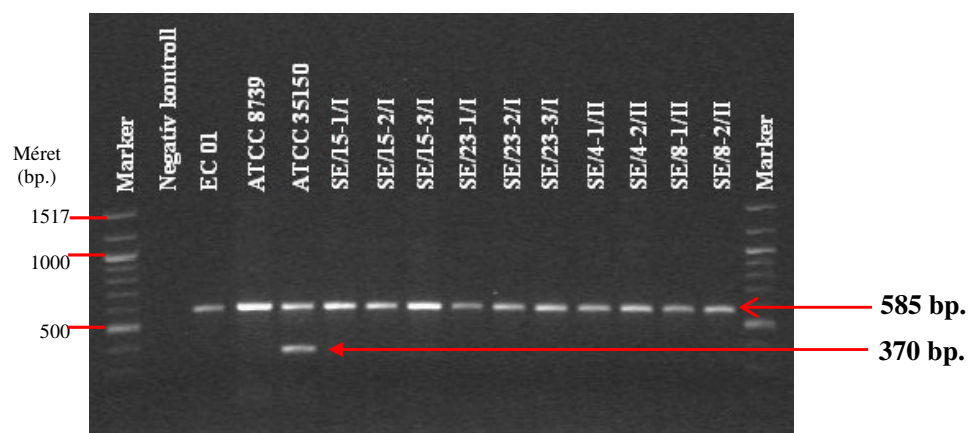
21. táblázat: A duplex PCR módszer optimalizálásának eredményei különböző primer koncentrációk alkalmazásával

Kód	Szerotípus	Szimplex PCR		Duplex PCR*		Duplex PCR **		Duplex PCR***	
		<i>malB</i>	<i>hlyA</i>	<i>malB</i>	<i>hlyA</i>	<i>malB</i>	<i>hlyA</i>	<i>malB</i>	<i>hlyA</i>
ED172	O103:H2	+	+	((+))	+	(+)	+	+	+
ED82	O111:H-	+	+	((+))	+	(+)	+	+	+
ED226	O113:H21	+	+	((+))	+	(+)	+	+	+
ED56	O26:H11	+	+	((+))	+	(+)	+	+	+
ATCC 35150	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
62	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
EF3	O26:H-	+	-	+	-	+	-	+	-

* a primerek alkalmazása 1:1 arányban (0,25 µM Eco1/Eco2 és 0,25 µM O157-3/O157-4); ** a primerek 1:0,75 arányú alkalmazása (0,25 µM Eco1/Eco2 és 0,1875 µM O157-3/O157-4); *** a primerek 1:0,5 arányú (0,25 µM Eco1/Eco2 és 0,125 µM O157-3/O157-4) alkalmazása a duplex PCR során.

A 21. táblázat alapján megállapítható, hogy a vizsgált törzseknél abban az esetben kaptam a szimplex PCR-rel azonos eredményeket, amikor a fajspecifikus primereket 0,25 µM, a szerotípusra specifikus primereket pedig 0,125 µM koncentrációban alkalmaztam. Az így megállapított optimális primer koncentrációval letesztelve a 20. táblázatban feltüntetett valamennyi izolátumot minden esetben a szimplex PCR reakcióval azonos eredményt kaptam.

Az élelmiszerek és azokkal érintkező felületek vizsgálata során izolált 22 *Escherichia coli*-nak vélt izolátum pontos azonosítását, valamint a faj O157:H7 szerotípusának esetleges jelenlétét az optimált duplex PCR módszerrel végeztem el. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a szelektív táptalajról izolált valamennyi izolátum az *Escherichia coli* fajba tartozott, azonban mivel egyetlen izolátum sem adott jelet az O157:H7 szerotípusra specifikus primer párral megállapítható, hogy a faj ezen patogén szerotípusa nem fordult elő az általam izolált törzsek között. A 6. ábra az optimális paraméterek alkalmazása mellett kapott duplex PCR eredményeit szemlélteti élelmiszerekről, illetve élelmiszerekkel érintkező felületekről származó néhány izolátum esetén.

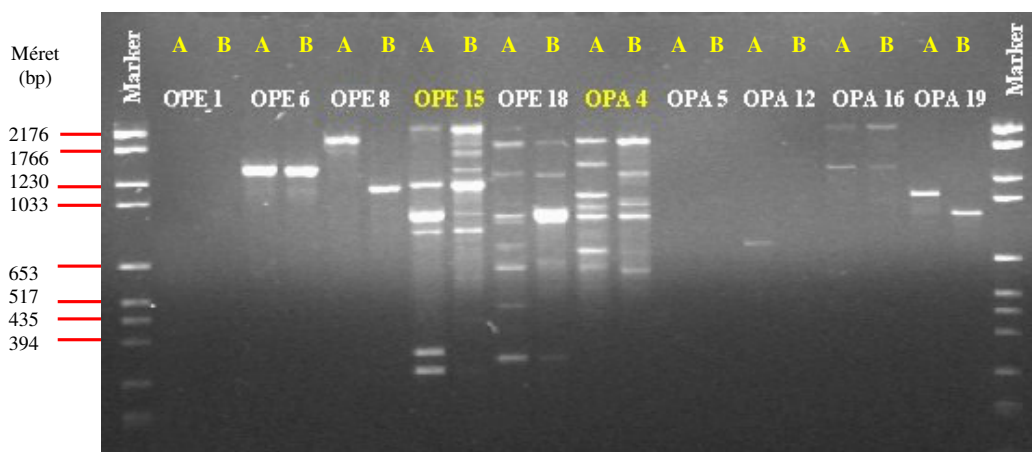


6. ábra: Az *Escherichia coli* izolátumok azonosításához alkalmazott duplex PCR reakció eredménye az optimálást követően

EC01, ATCC 8739: nem-patogén *E. coli* törzsek; ATCC 35150: *E. coli* O157:H7 szerotípusú törzs; SE jelű törzsek: élelmiszerekről és élelmiszerekkel érintkező felületekről izolált *E. coli* törzsek

5.2.2. *Escherichia coli* izolátumok tipizálása RAPD-PCR analízissel

Az izolátumok törzs szinten történő elkülönítésére RAPD-PCR vizsgálatot alkalmaztam. Tíz különböző indító szekvenciát teszteltem előzetesen két, biztosan eltérő törzs (SE/1-2/I és SE/4-1/II) segítségével annak érdekében, hogy az izolátumok tipizálása során a leginkább megfelelő primereket alkalmazhassam. A 7. ábra az eltérő szekvenciájú primerekkel kapott mintázatokat mutatja, amely alapján a további vizsgálatokhoz az OPE 15 és az OPA 4 indító szekvenciákat választottam ki.

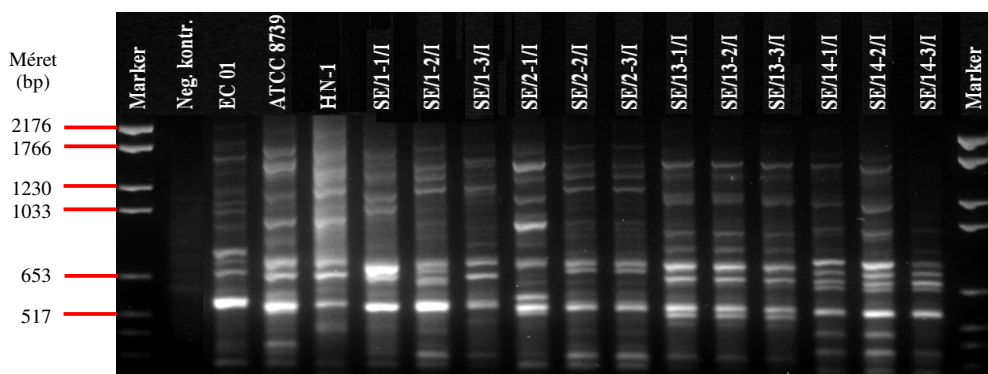


7. ábra: Primerek tesztelése és kiválasztása az *E. coli* izolátumok RAPD-PCR analíziséhez

A: *E. coli* SE/1-2/I, B: *E. coli* SE/4-1/II

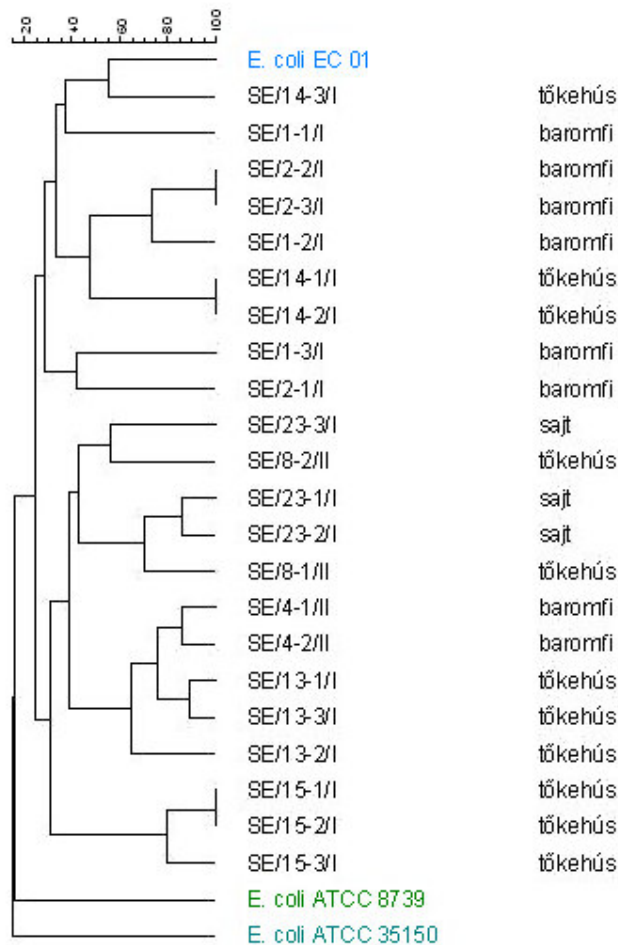
Mivel két primer általában nem elegendő nagyszámú izolátum megfelelő tipizálásához, ezért a következő lépésben egy újabb primer tesztelése vált szükségessé. A tesztelés alapján az M13

miniszatellit primer alkalmasnak bizonyult a vizsgált izolátumok DNS-ének felszaporítására, mivel a PCR reakciót követően az agaróz gélelektroforézissel kapott mintázatok jól értékelhetőnek bizonyultak. Az izolátumok tipizálásához így az OPE 15 és OPA 4 primerek mellett az M13 indító szekvenciát választottam. Az M13 primerrel végzett RAPD analízis során a primer kötési hőmérséklete a miniszatellitekre jellemzően magasabb, 40 °C volt. A 8. ábrán az *E. coli* izolátumok M13 primerrel kapott mintázataira látható példa.



8. ábra: *Escherichia coli* izolátumok molekuláris ujjlenyomata az M13 miniszatellit primerrel

A három primerrel kapott mintázatok (molekuláris ujjlenyomatokat) a GelCompare II szoftver segítségével értékeltem, amely eredményeképpen a 9. ábrán látható kombinált dendrogramot készítettem el. A hasonlósági törzsfá alapján megállapítható, hogy a referencia törzsek (*E. coli* ATCC 8739 – nem patogén és *E. coli* ATCC 35150 – O157:H7 szerotípusú törzs) már alacsony, 20 %-os hasonlósági szintnél elkülönültek a vizsgált izolátumoktól. A dendogramból az is jól látható, hogy a vizsgált *E. coli* izolátumok nagyfokú változatosságot mutattak (a 22 izolátum 19 csoportra különült el), továbbá, hogy az egyes mintavételi egységek (baromfi, tökehús, sajt) esetében, sőt, ugyanazon az eszközön is többnyire eltérő törzsek fordultak elő, tehát keresztkontamináció nem volt kimutatható.



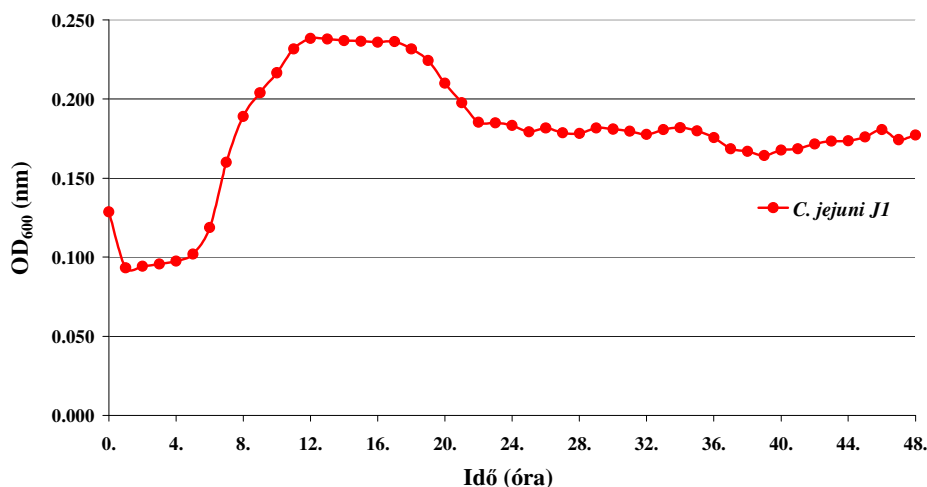
9. ábra: Az *Escherichia coli* izolátumok RAPD-PCR vizsgálatán alapuló kombinált dendrogramja három primerrel (OPE 15, OPA 4 és M13) kapott eredmények alapján

5.3. *Campylobacter jejuni* és *C. coli* törzsek kompetíciója szelektív dúsítás során

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam a nagyszámú enterális megbetegedés kialakulásáért felelős két termofil *Campylobacter* faj (*Campylobacter jejuni* és *Campylobacter coli*) között esetlegesen fellépő versengést a szelektív dúsítás során, a két faj különböző törzseit párokban oltottam be az EN ISO 10272-1:2006 szabvány által előírt Bolton szelektív dúsító folyadékba. Az inkubálást követően szelektív táptalajra való oltás után a statisztikai értékeléshez elegendő számú telepet visszaizolálva határoztam meg a törzsek egymáshoz viszonyított arányát.

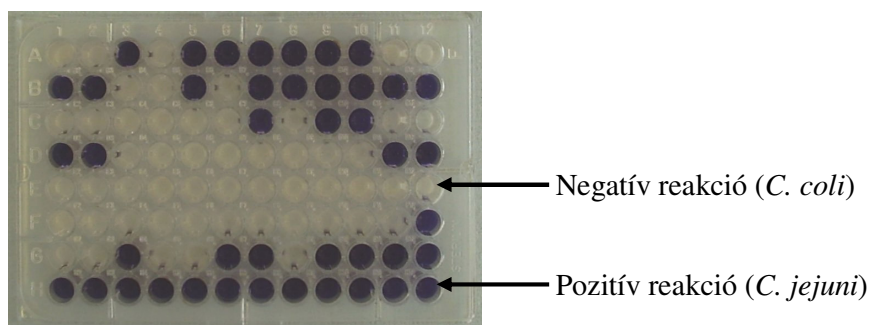
A vizsgálat elvégzése előtt elkészítettem a tesztörzsek szaporodási görbéit, mivel az volt a célom, hogy a szelektív dúsítókat azonos növekedési fázisból származó sejtekkel oltsam be. A korai stacioner fázis eléréséhez szükséges idő meghatározásánál azt tapasztaltam, hogy 41,5 °C-on inkubálva mindkét faj törzsei 18 óra után általában elérték ezt a szakaszt, azonban lényeges

eltéréseket figyeltem meg a lappangási fázisok időtartamai között. A 10. ábrán a J1 jelű *C. jejuni* törzs szaporodási görbéje látható példaként.



10. ábra: A *Campylobacter jejuni* J1-es törzs szaporodási görbéje Bioscreen C készülékkel meghatározva

A dúsítási kísérletek megkezdése előtt tesztelni kívántam a kiválasztott két faj elkülönítéséhez használandó módszer alkalmazhatóságát. A Hwang és Ederer (1975) által leírt hippurát hidrolízis teszt miniaturizált változatát alkalmaztam, mivel a *C. jejuni* pozitív, a *C. coli* pedig negatív erre a tesztre. Mindkét *Campylobacter* faj vizsgált törzsei a várt reakciókat adták (a *C. jejuni* izolátumok esetében a lila szín megjelenése jelezte a pozitív reakciót, míg a *C. coli* törzsek esetén a negatív tesztet az elszíneződés hiánya jelentette) alátámasztva ezáltal alkalmazhatóságát a tesztörzsek elkülönítésére (11. ábra).



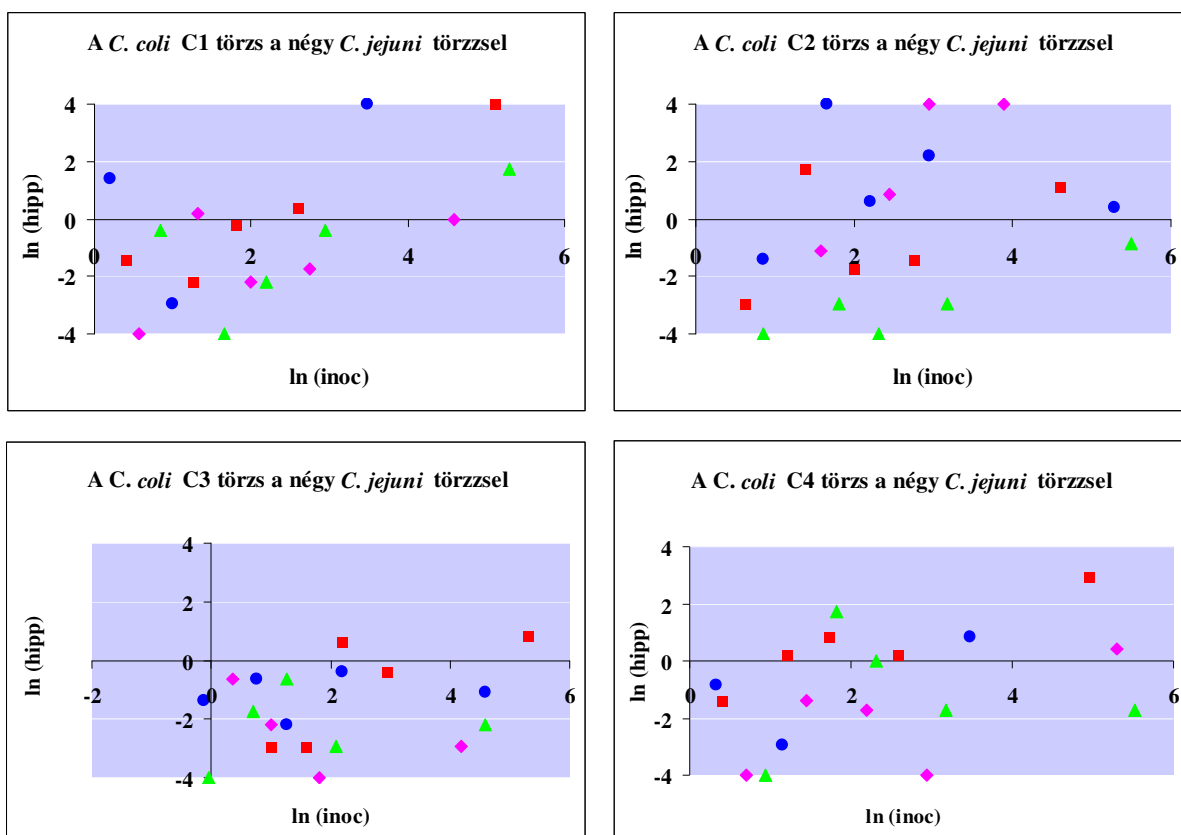
11. ábra: A miniaturizált hippurát hidrolízissel kapott eredmények a C1 és J3 törzsek (5. táblázat) esetén

Az azonosításra használt hippurát hidrolízis teszt nem mindig alkalmazható egyedüli módszerként a *C. jejuni* és *C. coli* fajok elkülönítésre, mivel esetenként a *C. jejuni* törzsek hippurikáz génje (*hipO*

gén) nem expresszálódik, így hamis negatív eredmények is megfigyelhetők ezen izolátumok között (Hani és Chan, 1995). Vizsgálataim során azonban olyan törzseket alkalmaztam, amelyek pontos faji azonosítása fenotípus és genotípus meghatározáson alapuló módszerekkel megtörtént és a hippurát hidrolízis tesztet elvégezve valamennyi *C. coli* törzs esetén negatív, míg valamennyi *C. jejuni* törzs esetén pozitív reakció volt megfigyelhető. Ez lehetővé tette a két faj vizsgált törzseinek elkülönítését ezzel a tesztel.

A szelektív dúsító *C. coli* és *C. jejuni* sejtekkel különböző arányban történő beoltásához a vizsgált törzsekből készített szuszpenziók sejtkoncentrációját Thoma kamra segítségével határoztam meg, valamint ezzel párhuzamosan felületi szélesztést is végeztem az élő sejtek sejtkoncentrációjának meghatározásához. A két módszerrel kapott eredmények lényegesen nem tértek el egymástól, ezért a mikroszkópos sejtszámolási eljárást alkalmaztam a beoltási sejtkoncentrációk meghatározásához. A későbbiekben a ténylegesen beoltott sejtek arányát azonban a tenyésztéses módszerrel kapott eredmények alapján adtam meg, így eltérés adódott a tervezett és a valóban beoltott sejtarányok között, ezt azonban mindig figyelembe vettem a kiértékelés során.

A dúsítást követően a szelektív táptalajon kinőtt telepek azonosításával kapott eredmények értékelése során első lépésben a hippurát pozitív (*C. jejuni*) és hippurát negatív (*C. coli*) telepszámokat elosztottam egymással, majd a kapott értékek természetes alapú logaritmusát vettem („ln hipp”). Hasonló módon jártam el az eredetileg beoltott *C. jejuni* és *C. coli* sejtek arányaival is (tenyésztéses módszerrel meghatározott sejtkoncentráció alapján kiszámítva), meghatározva ezáltal az „ln inoc” értékeket. Abban az esetben, ha a vizsgált *C. jejuni* törzs jobban szaporodott, mint a párban vele együtt oltott *C. coli* izolátum, a hippurát pozitív és hippurát negatív telepek hányadosából képzett logaritmus 0-nál magasabb értéket adott, míg ellenkező esetben (ha a *C. coli* szaporodott jobban) a kapott érték 0 alatti volt. Az így meghatározott számérték alapján diagramokat készítettem, amelyek esetében az x tengely fölött elhelyezkedő pontok azon eseteket mutatják, ahol a visszaizolált *C. jejuni* telepek száma volt magasabb, míg az abszcissa alatt elhelyezkedő pontok ennek ellentettjét jelölik. A 16 kombinációban (4.5.5. fejezet, 8. táblázat) eltérő inokulum mennyiségekkel elvégzett dúsítások eredményeit a 12. ábra mutatja. A vizsgálatok jelentős részében a pontok az x tengely alá estek, mutatva ezáltal a *C. coli* törzsek (C1, C3 és C4) jobb szaporodási képességét a *C. jejuni* izolátumokkal szemben a dúsítás során. Csupán a J4 törzs C2 izolátummal való kombinációjában lehetett a *C. jejuni* jobb szaporodási képességét kimutatni. Az eredményekből az is megállapítható, hogy a C3 jelű *Campylobacter coli* szorította vissza a *C. jejuni* izolátumok szaporodását a legnagyobb mértékben.



12. ábra: *C. coli* és *C. jejuni* törzsek sejtarányának összehasonlítása a dúsítás előtt és azt követően. A trendvonal (az x tengely) azt a várt összefüggést mutatja, amely során a törzsek azonos módon szaporodnak a dúsítás folyamán.

Jelmagyarázatok: *C. jejuni* izolátumok ■ J1, ◆ J2, ▲ J3, ● J4; ln (hipp): a hippurát pozitív (*C. jejuni*) és a hippurát negatív (*C. coli*) telepek hányadosának természetes alapú logaritmus; ln (inoc): a beoltott sejtarányok (*C. jejuni/C. coli*) természetes alapú logaritmus.

A Student-féle t-tesztel azt vizsgáltam, hogy az „ln inoc” és az „ln hipp” minták azonos sokaságból származtak-e, tehát, hogy a dúsítás milyen hatással volt a vizsgált izolátumokra. A 22. táblázatban látható, hogy annak valószínűsége, hogy a dúsítás nem volt hatással a tanulmányozott törzsekre, kevesebb, mint 10^{-4} .

22. táblázat: A Student-féle t-tesztel kapott valószínűségi (p) értékek a *Campylobacter* törzsek szelektív dúsítási vizsgálata során

Összehasonlítások	p-értékek
A <i>C. coli</i> C1 izolátum a négy <i>C. jejuni</i> törzzsel	$2,90 \times 10^{-5}$
A <i>C. coli</i> C2 izolátum a négy <i>C. jejuni</i> törzzsel	$3,76 \times 10^{-4}$
A <i>C. coli</i> C3 izolátum a négy <i>C. jejuni</i> törzzsel	$1,00 \times 10^{-6}$
A <i>C. coli</i> C4 izolátum a négy <i>C. jejuni</i> törzzsel	$5,20 \times 10^{-5}$

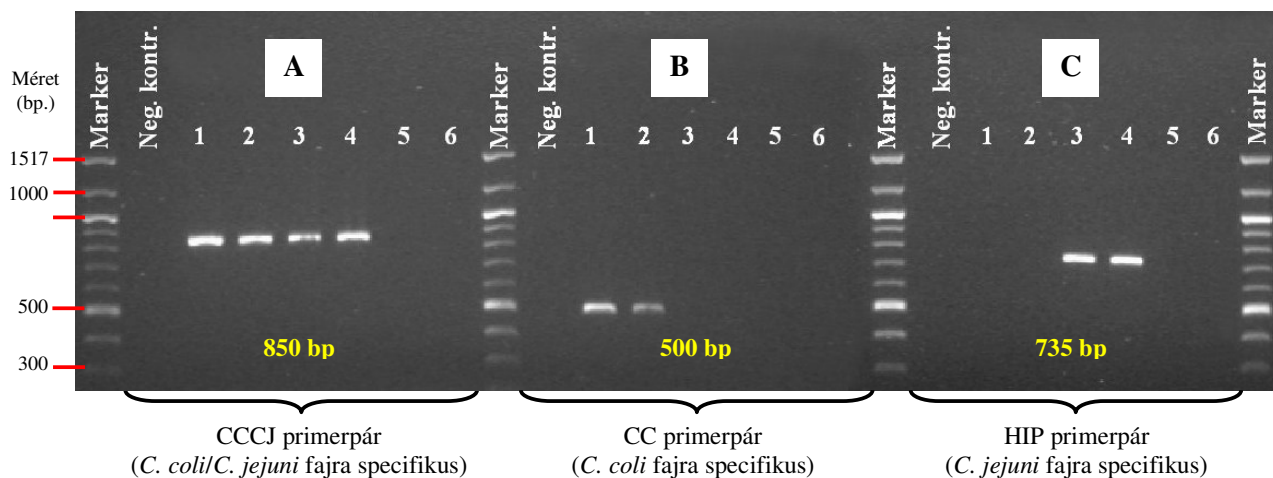
Megállapítható tehát, hogy a kezdeti és a dúsítást követő *C. jejuni* és *C. coli* sejtszám arányok jelentősen különböztek, vagyis a dúsítás során valamelyik vizsgált izolátum mindig jobban szaporodott a vele párban beoltott, másik fajhoz tartozó törzshöz képest.

5.4. Élelmiszer-biztonsági jelentőségű *Campylobacter* fajok molekuláris biológiai vizsgálata

5.4.1. *Campylobacter* izolátumok faj színű azonosítása specifikus primerekkel

A kampilobakterekkel végzett munkám során összesen 55 *Campylobacter* izolátum molekuláris vizsgálatát végeztem el. A törzsek eltérő forrásokból, különböző időpontokban kerültek izolálásra. A vizsgált kampilobakterek közül 15 izolátum humán székletből, 9 tejből, 8 szarvasmarhából, 9 sertésből, 14 pedig baromfiból vagy baromfi hússal érintkező felületekről származott. A tejből 2002-ben, sertésből, szarvasmarhából, székletből 2003 során, míg baromfiból és baromfi hússal érintkező felületekről 2003-ban és 2005-ben történt az izolálás.

Az izolátumok azonosításához három primer párt alkalmaztam, amelyek közül az egyik a *C. coli* és *C. jejuni* 16S rRNS-ét kódoló gén egy adott szakaszára specifikus (CCCJ primerpár), így a két faj kimutatása egyetlen PCR reakcióban lehetséges. Az indító szekvenciák alkalmazhatóságának vizsgálata érdekében a *C. jejuni* és *C. coli* törzsgyűjteményi törzsek mellett a szintén termofil csoportba tartozó *C. lari* és *C. upsaliensis* esetében is elvégeztem a polimeráz láncreakciót, amelynek eredményét a 13/A. ábra szemlélteti.

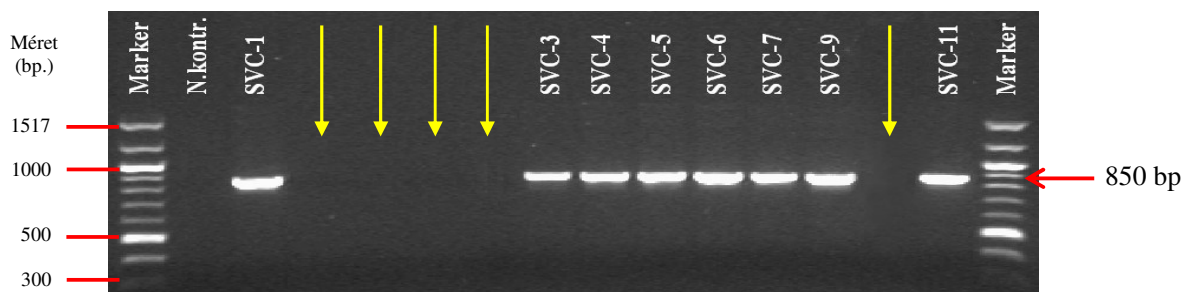


13. ábra: A *Campylobacter* izolátumok azonosításához alkalmazandó primerek (CCCJ, a CC és a HIP primer párok) tesztelésének eredménye referencia, illetve típus törzsekkel

1: *C. coli* HNCMB 200004^T, 2: *C. coli* CCM 7227, 3: *C. jejuni* CCM 6214^T, 4: *C. jejuni* HNCMB 200006, 5: *C. lari* CCM 4897^T, 6: *C. upsaliensis* CCUG 14913^T

Az amplifikálás a pozitív minták (*C. coli* és *C. jejuni*) esetében egy körülbelül 850 bázispár nagyságú fragmentumot eredményezett, míg a *C. lari* és *C. upsaliensis* esetében nem keletkezett termék a PCR reakció során. A pontos faji azonosítás érdekében a *Campylobacter jejuni* fajra specifikus HIP primereket és a *C. coli* fajra specifikus CC primereket (9. táblázat) alkalmaztam. A hippurikáz gén, amely csak a *C. jejuni* faj genomjában található meg, a specifikus primerekkel csupán a két tesztelt *C. jejuni* esetében volt amplifikálható (13/C ábra). Hasonló specifikusság volt tapasztalható a *C. coli* faj azonosításához kipróbált, az aszpartokináz génre specifikus CC primer pár esetén, mivel -mint ahogyan az a 13/B. ábrán megfigyelhető- az agaróz gélen csak a *C. coli* törzsek esetében látható PCR termék. A kiválasztott primer párok tehát mindhárom PCR esetében a megfelelő eredményeket adták a törzsgyűjteményi törzsekkel, így a továbbiakban ezen indító szekvencia párokat használtam az izolátumok faji azonosításához.

Az 5.1. fejezetben említett, a *Campylobacter* szelektív táptalajról származó izolátumok tiszta tenyészetek PCR-es vizsgálatát a *C. jejuni* és *C. coli* fajokra specifikus primer párral (CCCJ) elvégezve öt izolátum esetében nem volt termékképződés megfigyelhető (14. ábra), míg a többi izolátum esetében a megfelelő méretű ampikonok keletkezése a minták *C. jejuni* vagy *C. coli* fajba való tartozására utalt. A CCCJ primer párt alkalmazva a többi (47) izolátum is pozitív eredményt adott.



14. ábra: A *Campylobacter* izolátumok gyűjtése során a szelektív táptalajról izolált tizenhárom baktérium CCCJ primer párral kapott PCR vizsgálatának eredménye

SVC-1, SVC-3, SVC-4, SVC-5, SVC-6, SVC-7, SVC-9, SVC-11: baromfihúsról, illetve baromfihússal érintkező felületekről izolált *Campylobacter* törzsek; a sárga nyilak azt az öt izolátumot jelölik, amelyek esetében nem keletkezett PCR termék

A *C. jejuni*/*C. coli*-ként azonosított izolátumok további, pontosabb faj szintű azonosításához alkalmazott HIP indító szekvencia párral az 55 vizsgált *Campylobacter* izolátum közül 24 adott egyértelmű jelet, míg a CC primerpárral 31 izolátum. A *C. jejuni* és *C. coli* fajspecifikus primer párokkal elvégzett azonosítás eredményeit a 23. táblázatban foglaltam össze.

23. táblázat: A *Campylobacter* izolátumok specifikus primer párokkal elvégzett PCR-es azonosításának eredményei

Jelölés	Azonosított faj	Eredet
2219/1	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2219/2	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2221/1	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2221/2	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2234/1	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2248/1	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2248/2	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2264/1	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2264/2	<i>Campylobacter coli</i>	tej
2236/2	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
2236/3	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
2249/3	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
2256/3	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
14464	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
14568	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
14573	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
14575	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
14771	<i>Campylobacter coli</i>	sertés
2265/1	<i>Campylobacter coli</i>	szarvasmarha
14591	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
15030/3	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
18741	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
SVC-1	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi műanyag vágódeszka
SVC-5	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
SVC-6	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi műanyag vágódeszka
SVC-7	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
SVC-9	<i>Campylobacter coli</i>	baromfi
29045	<i>Campylobacter coli</i>	humán
29077	<i>Campylobacter coli</i>	humán
31308	<i>Campylobacter coli</i>	humán
31981	<i>Campylobacter coli</i>	humán
11601	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
11623/3	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
11626	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
13120/2	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
13144	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
14538/2	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
14864/1	<i>Campylobacter jejuni</i>	szarvasmarha
13096	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
13145	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
14456	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
SVC-3	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
SVC-4	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
SVC-11	<i>Campylobacter jejuni</i>	baromfi
28890	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
28952	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
30168	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
31098	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
31126	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
31411	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
31422	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
31815	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
32118	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
32657	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán
32203	<i>Campylobacter jejuni</i>	humán

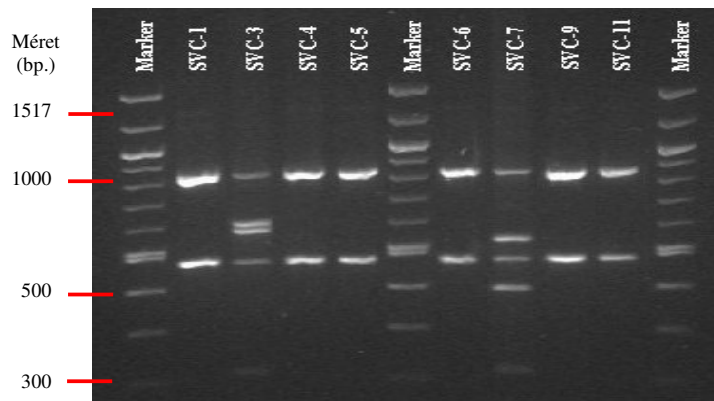
5.4.2. PCR-alapú molekuláris módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata *Campylobacter* izolátumok tipizálása céljából

A kampilobakterek faj szintű meghatározása fenotípusos tulajdonságaik alapján hamis eredményekhez vezethet, mivel számos fajhoz atípusos fenotípusos eredményeket adó törzsek is tartoznak. Így a *Campylobacter* fajok epidemiológiájának, valamint az állatok és az emberek egészségére kifejtett hatásának további megértéséhez jobb izolálási, azonosítási és tipizálási módszerek szükségesek (Kärenlampi et al., 2004). Az epidemiológiai vizsgálatokban a terjedési útvonalak feltárása érdekében a *Campylobacter* fajok megbízható azonosításához és tipizálásához olyan molekuláris módszerek szükségesek, amelyek megfelelő diszkriminációs képességgel rendelkeznek (Moreno, Y et al, 2002).

Az eltérő időpontokban izolált, különböző helyekről származó *Campylobacter* izolátumok azonosításához és tipizálásához kampilobakterek esetében eddig még nem vizsgált, illetve korábban már leírt PCR alapú módszerek alkalmazhatóságát hasonlítottam össze.

5.4.2.1. *Campylobacter* izolátumok rDNS-RFLP vizsgálatának eredményei

A 16S rRNS-t kódoló gén felszaporítását követően a közel 1500 bázispár hosszúságú szekvenciákat négy különböző restrikciós endonukleázzal (*AluI*, *RsaI*, *MspI* és *HaeIII*) hasítottam el, majd a kapott mintázatok alapján a négy enzim kombinált dendogramját készítettem el. Valamennyi vizsgált izolátum és típus/referencia törzs esetében kaptam amplifikációs terméket a polimeráz láncreakciót követően, tehát a baktériumoknál univerzális reverz és a legtöbb baktérium esetében alkalmazható forward primer alkalmasnak bizonyult a *Campylobacter* izolátumok 16S rDNS génjének felszaporítására. A hasítás során a négy enzim közül az *MspI* endonukleázzal kaptam a legtöbb eltérő mintázatot - erre látható példa a 15. ábrán - azonban még ebben az esetben is kismértékű volt a mintázatok polimorfizmusa.

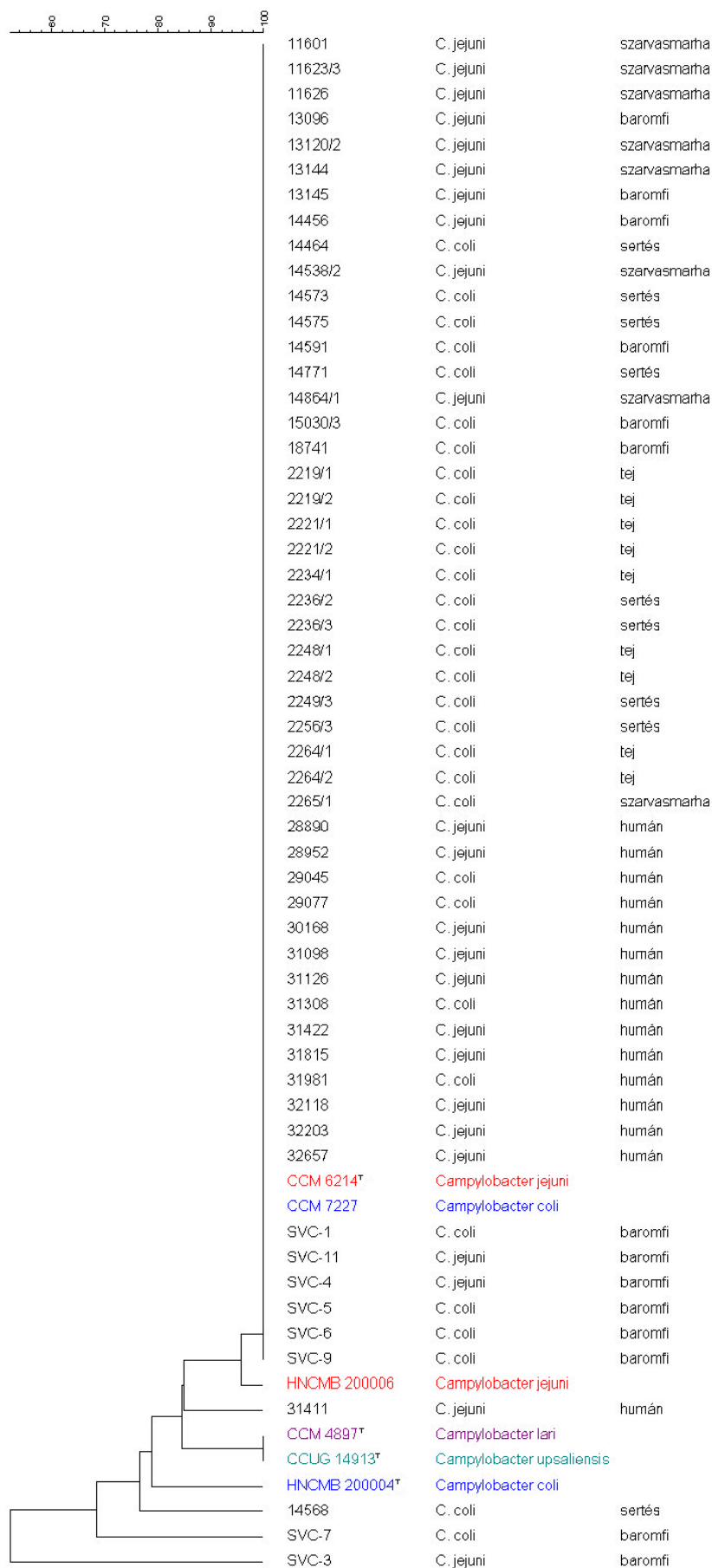


15. ábra: *Campylobacter* izolátumok *MspI* restrikciós enzimmel kapott hasítási mintázatai

Marker: 100 bázispáros marker; SVC-1: *C. coli*; SVC-3: *C. jejuni*; SVC-4: *C. jejuni*; SVC-5: *C. coli*; SVC-6: *C. coli*; SVC-7: *C. coli*; SVC-9: *C. coli*; SVC-11: *C. jejuni*

A kombinált dendrogram (16. ábra) alapján jól látható, hogy a 16S rRNS gén restrikciós vizsgálatával a *C. coli* CCM 7227, a *C. jejuni* 6214^T törzsek és a vizsgált izolátumok jelentős részének elkülönítése nem volt megvalósítható, mivel ezen törzsek a négy enzimmel kapott mintázatuk alapján 100 %-os hasonlóságot mutattak egymással. A *C. jejuni* HNCMB 200006, a *C. lari* CCM 4897^T, a *C. upsaliensis* CCUG 14913^T, a *C. coli* HNCMB 200004^T törzsek, valamint négy izolátum (két *C. jejuni* – 31411 és SVC-3 – és két *C. coli* – 14568 és SVC-7) azonban elkülönült ettől a nagy csoporttól. Bár a *C. lari* és *C. upsaliensis* típustörzsek 86 %-os hasonlósági szintnél elváltak a fent említett nagy csoporttól, egymással azonban 100 %-os hasonlóságot mutattak, vagyis a négy alkalmazott enzimmel ezek a törzsek sem voltak egymástól elkülöníthetők. A vizsgált *Campylobacter* törzsek közül az egyik humán *C. jejuni* izolátum 85 %-os, a másik három izolátum (egy *C. jejuni* és két *C. coli*) pedig 78, 70, illetve 54 %-os hasonlósági szintnél vált el a többi izolátumtól. Megállapítható tehát, hogy a 16S rRNS gén RFLP analízise nem tekinthető általánosan alkalmazhatónak faji identifikálásra, néhány esetben azonban egyes referencia és típustörzsek, valamint izolátumok egyedi RFLP mintázatot adtak.

A 11.1 melléklet 29-30. számú ábráin az izolátumok fajonkénti csoportosításával elkészített kombinált dendrogramok láthatók. Megállapítható, hogy mind a vizsgált *C. coli*, mind pedig a *C. jejuni* izolátumok 3-3- csoportba voltak sorolható, tehát két-két törzs kivételével valamennyi izolátum 100 % hasonlóságot mutatott egymással. A külön-külön elkészített törzsfák segítségével a módszer fajon belüli diszkriminációs képességének meghatározása vált lehetővé, ami követte a fajok kombinált dendrogramjában látható diszkriminációs jellemzőit.

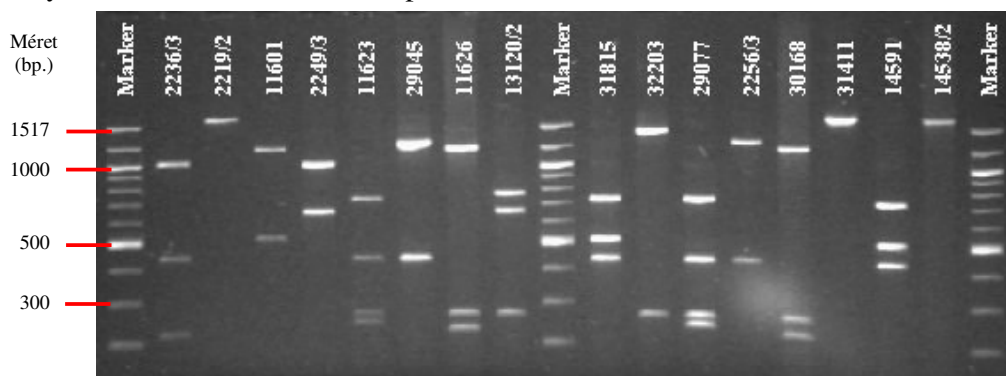


16. ábra: A vizsgált kampilobakterek 16S rDNS-RFLP módszerrel kapott kombinált dendogramja

5.4.2.2.

Campylobacter izolátumok tipizálása *flaA*-RFLP vizsgálattal

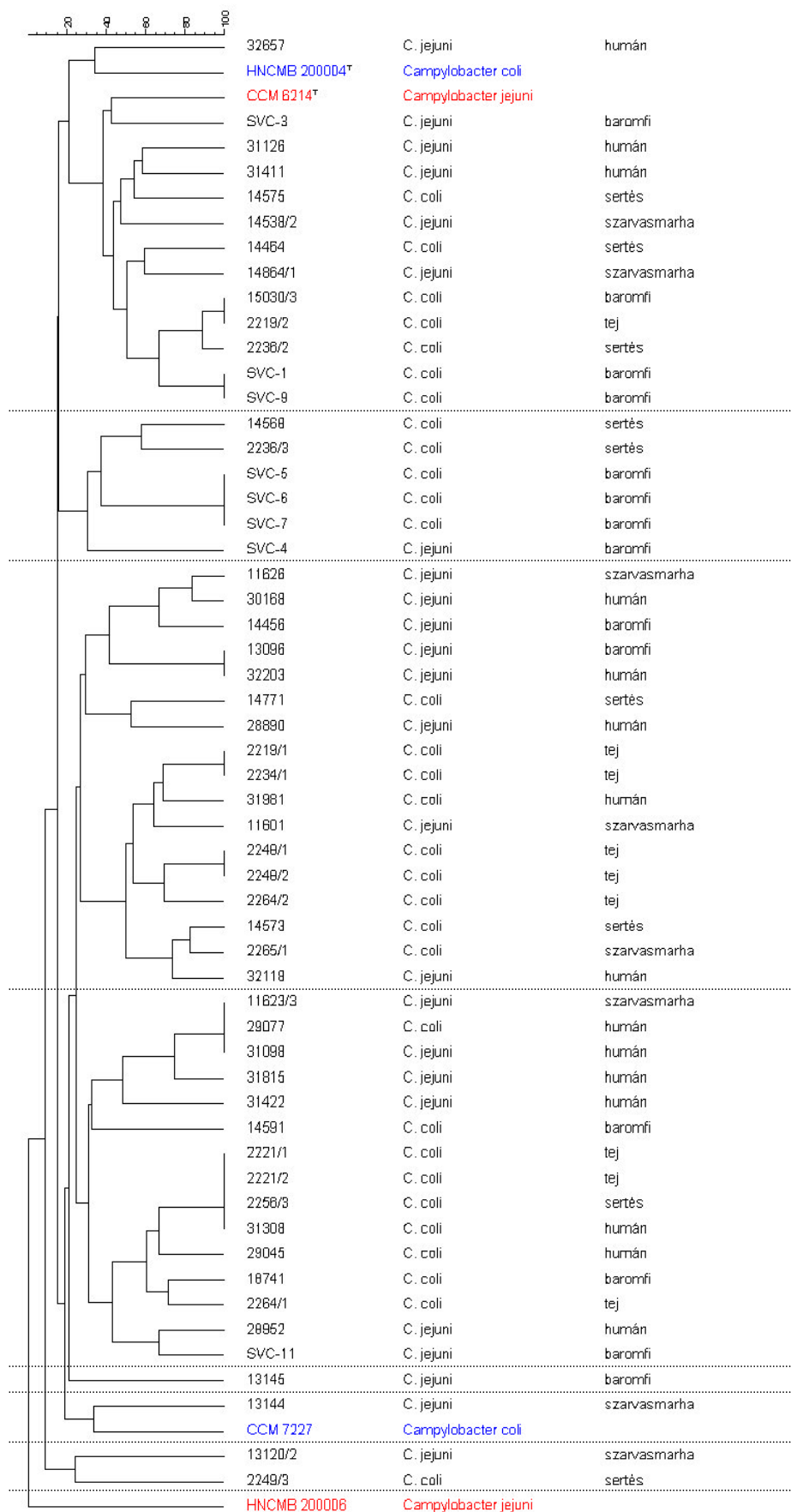
A flagellint kódoló *flaA* gén a kampilobakterek egyik legjobban jellemzett génje. A PCR reakcióban specifikus primerek segítségével felszaporított DNS darabok restrikciós enzimekkel történő hasításával a különböző szekvenciák közötti hossz polimorfizmus megállapítható. Az izolátumok *flaA*-RFLP vizsgálata során az irodalomból vett specifikus primerekkel felszaporított mintegy 1700 bázispár hosszúságú amplikonokat *DdeI*, *HhaI* és *AluI* enzimekkel hasítottam. A 17. ábrán néhány izolátum *HhaI* enzimmel kapott restrikciós mintázata látható.



17. ábra: Különböző eredetű *Campylobacter* izolátumok *HhaI* restrikciós endonukleázzal kapott hasítási mintázata

C. coli izolátumok: 2236/3, 2219/2, 2249/3, 29045, 29077, 2256/3, 14591; *C. jejuni* izolátumok: 11601, 11623/3, 11626, 13120/2, 31815, 32203, 30168, 31411, 14538/2

A *flaA* gén felszaporításához használt, Nachamkin és munkatársai által leírt (1996) primer párral (CA-F és CA-R) a *C. coli* és *C. jejuni* típus- és referenciatörzsekhez hasonlóan valamennyi izolátum esetében megfelelő méretű amplikonokat kaptam. Kivételt ezalól a *C. lari* és a *C. upsaliensis* típus-törzsek jelentettek, ezek esetében ugyanis nem keletkezett amplifikációs termék a polimeráz láncreakciót követően. A fragmentumok hasításához a *DdeI* enzimet alkalmazva az 55 törzs esetében 36 különböző restrikciós mintázatot lehetett elkülöníteni, az *AluI* enzimmel 33-at, míg a *HhaI* endonukleázzal csupán 20-at. A három enzimmel kapott mintázatok alapján elkészített kombinált dendogramból (18. ábra) jól látható, hogy a vizsgált izolátumok több csoportra különülnek el és összesen 43 egyedi mintázattal rendelkeztek (a törzsgyűjteményi törzsekkel együtt ez összesen 47). Az egyes klaszterekbe mindkét faj törzsei megtalálhatóak, csupán az egymással 100 % hasonlóságot mutató izolátumok tartoznak ugyanabba a fajba. Ez alól egy csoport kivételt jelentett, ebben az esetben ugyanis egy *C. coli* (29077) és két *C. jejuni* izolátum (11623/3 és 31098) három enzimmel kapott restrikciós mintázata teljesen megegyezett, így a törzsek tipizálása érdekében a módszer feloldóképességét növelni kell. A 11.1 melléklet 31. és 32. ábrája a fajokénti kombinált dendogramokat mutatják. Mind a *C. coli* mind pedig a *C. jejuni* izolátumok 22 különálló klaszterbe voltak sorolhatók. Megfigyelhető, hogy a 100 %-ban hasonló izolátumok több esetben is eltérő forrásból származtak.

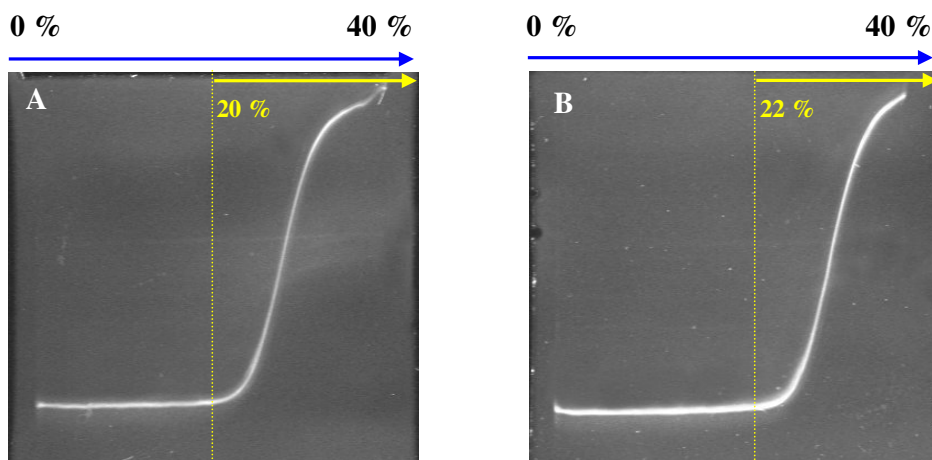


18. ábra: A *Campylobacter* izolátumok *flaA*-RFLP vizsgálatával kapott kombinált dendogramja

5.4.2.3. *Campylobacter* izolátumok tipizálása denaturáló gradiens gélelektroforézissel

A denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) során a vizsgált DNS szekvenciák növekvő koncentrációjú denaturáló gélben haladnak előre, így a két szál fokozatos szétválásával bekövetkező konformáció változás befolyásolja a DNS elektroforetikus mobilitását. A *Campylobacter* izolátumok DGGE vizsgálatához a flagellin fehérjét kódoló (*flaA* és *flaB*) gének közötti intergénikus szekvencia (4. ábra) egy körülbelül 200 bázispár hosszúságú szakaszát a Wegmüller és munkatársai (1993) által leírt CF02 és CF03 specifikus primerek segítségével szaporítottam fel, amelyek közül a reverz primer (CF03) az 5' végén egy GC gazdag régiót (ún. GC-kapcsot) tartalmazott.

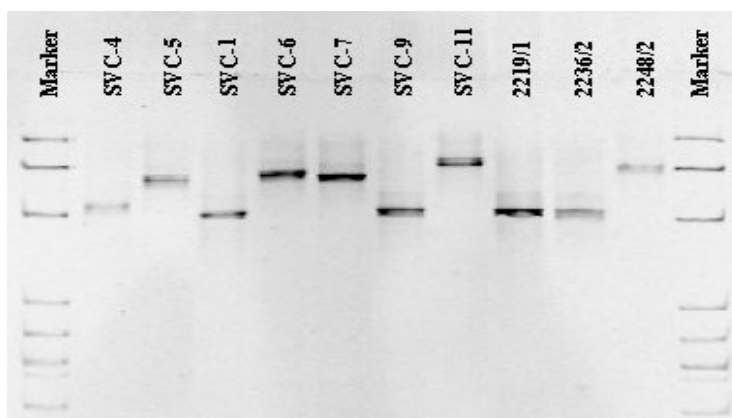
A párhuzamos DGGE vizsgálat során alkalmazandó optimális denaturálószer koncentráció meghatározását merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézist alkalmazva állapítottam meg. Az eljárás során a denaturálószer koncentrációjának növekedési iránya merőleges az elektroforézis irányára, így a módszer kiválóan alkalmas a vizsgált DNS olvadáspontjának meghatározáshoz, illetve a denaturáló gradiens optimális tartományának megállapítására. Első lépésben 0-100 % denaturáló tartományt, vizsgáltam, majd a későbbiekben ezt leszűkítettem 0-40 %-ra. A kapott eredmények alapján (19. ábra) a 20-40 % intervallumot választottam az izolátumok párhuzamos DGGE vizsgálatához.



19. ábra: A párhuzamos DGGE vizsgálat során alkalmazandó optimális denaturálószer koncentráció meghatározása merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézissel *Campylobacter jejuni* (A) és *Campylobacter coli* (B) törzsek esetében

A párhuzamos DGGE vizsgálatok során a DNS minták az elektroforézis irányával megegyező irányban haladnak. A két szál szétválásának (konformáció változásának) mértékétől függően a DNS a gélben lefékeződik, majd megáll, és a festést, valamint előhívást követően egyetlen, határozott

fragmentumként jelenik meg. A párhuzamos DGGE vizsgálatoknál alkalmazott denaturálószer koncentráció-tartomány megfelelőnek bizonyult az izolátumok közötti szekvencia különbségek kimutatására, mint ahogyan azt a 20. ábra is szemlélteti.

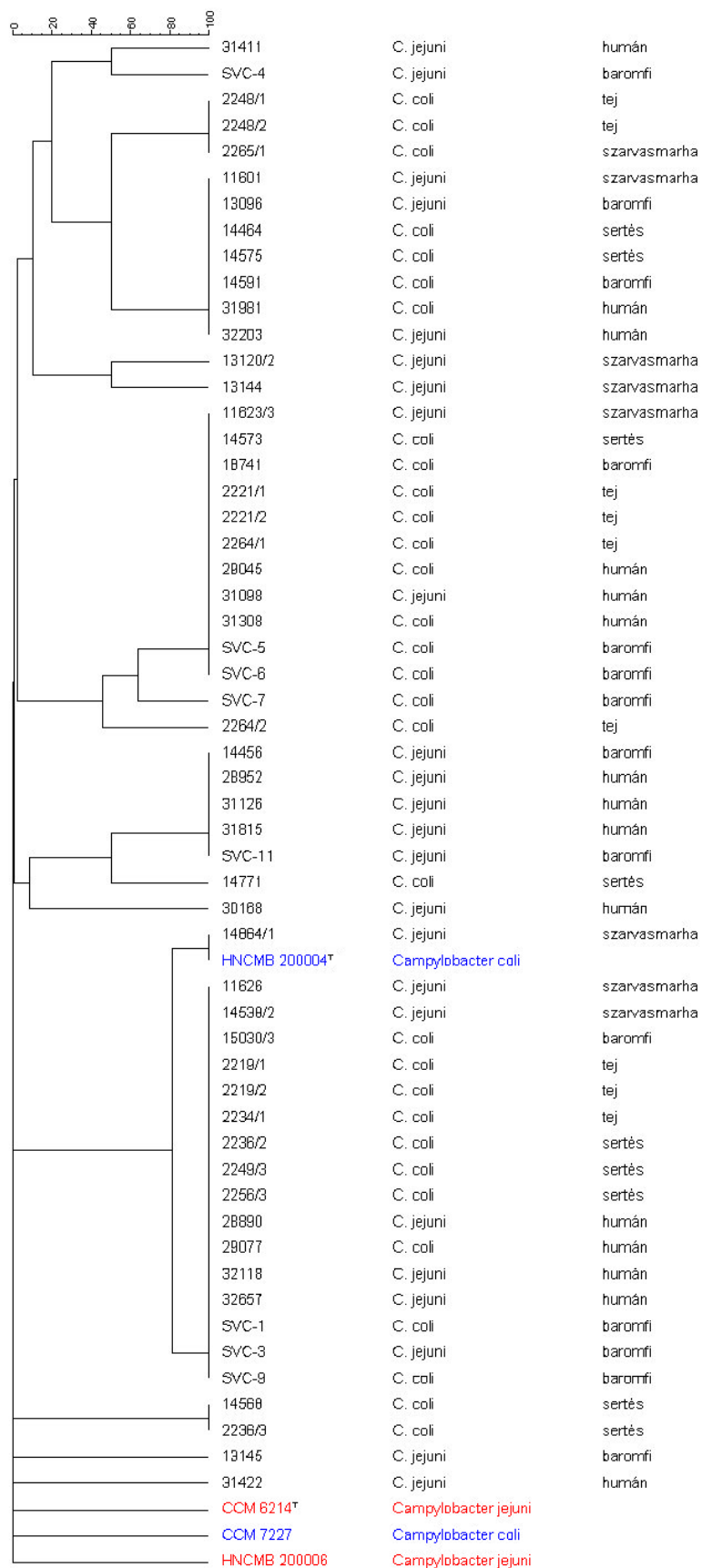


20. ábra: *Campylobacter* izolátumok *fla*-IGS fragmentumainak elhelyezkedése a denaturáló poliakrilamid gélben párhuzamos DGGE vizsgálatot követően

C. coli izolátumok: SVC-5, SVC-1, SVC-6, SVC-7, SVC-9, 2219/1, 2236/2, 2248/2; *C. jejuni* izolátumok: SVC-4, SVC-11

A poliakrilamid géleken megjelent fragmentumok különböző magasságban való elhelyezkedése nem a DNS-ek eltérő méretéből, hanem a fragmentumok szekvenciájában lévő különbségekből adódott. Az egyes izolátumok esetében kapott DNS sávok vándorlási távolságának összehasonlításából dendrogramot készítettem, amely a 21. ábrán látható.

A DGGE vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy az 55 izolátumot 17 (a típus- és referenciatörzsekkel együtt 20) csoportba lehetett sorolni a fragmentumok denaturáló gélben történő elhelyezkedése alapján. Megállapítható továbbá, hogy az eljárás a két faj elkülönítésére nem alkalmas, mivel egyes hasonlósági csoportok esetében a 100 % azonosságot mutató izolátumok között mind a *C. jejuni*, mind a *C. coli* fajhoz tartozó törzsek megtalálhatóak voltak. Az egyes klaszterek közötti nagyon kis hasonlósági százalék a kiértékelés során figyelembe vehető egyetlen fragmentumra vezethető vissza. Az amplikonokon belüli szekvencia különbségek következtében kialakuló részleges denaturáció kimutatható mértékű különbségeket jelentett az amplikonok vándorlásában ahhoz, hogy így a szekvencia polimorfizmus kimutatható legyen. A 11.1 melléklet 33. és 34. ábráján a két faj izolátumaiból külön-külön elkészített dendrogramok láthatók. A 31 vizsgált *C. coli* izolátum nyolc, míg a 24 *C. jejuni* tizenkét csoportba volt sorolható. A módszerrel azonosnak bizonyuló izolátumok ebben az esetben is eltérő forrásból származtak.



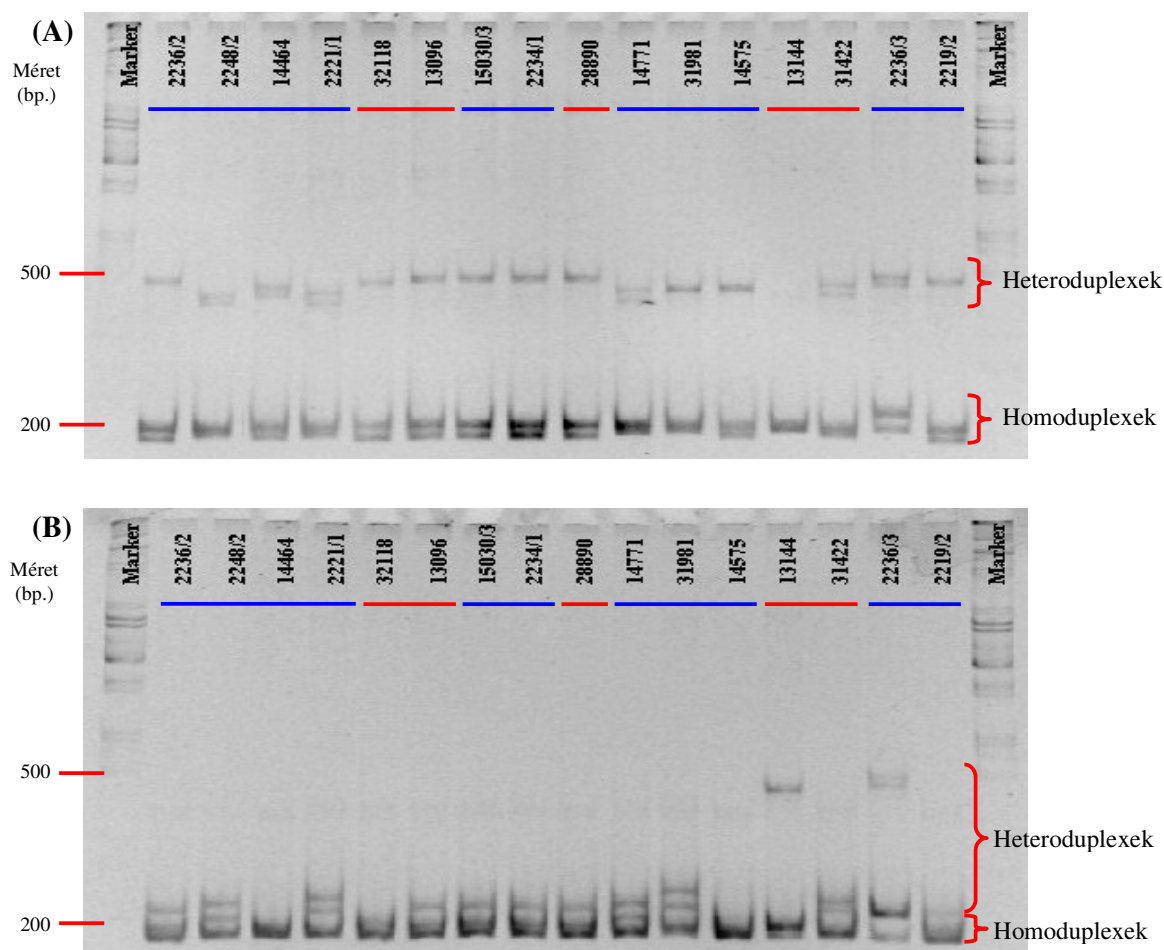
21. ábra: A *Campylobacter* izolátumok párhuzamos DGGE vizsgálatával kapott dendogramja

5.4.2.4.

Campylobacter izolátumok vizsgálata heteroduplex mobilitási eljárással

Az izolátumok heteroduplex mobilitási analízise (HMA) során a *C. jejuni* CCM 6214^T és a *C. coli* CCM 7227 törzsek flagellin gének közötti intergénikus régiójának a CF02-CF03 primer párral felszaporított szakaszát hibridizáltattam a vizsgálandó izolátumok ugyanezzel a primer párral amplifikált szakaszával.

A két különböző törzsből származó DNS-ek együttes hődenaturálása, majd lehűtése során az esetlegesen kialakuló heteroduplexek elektroforetikus mozgékonyasága megváltozik, ennek következtében a gélben az elektroforézis során lassabban vándorolnak. Az azonos amplikonok renaturációja következtében nagyobb mozgékonyaságú homoduplexek jönnek létre. A 22. ábrán *Campylobacter* izolátumok *C. coli* és *C. jejuni* törzsgyűjteményi (CCM) törzsekkel kapott heteroduplex mobilitási vizsgálatának eredményei láthatók.



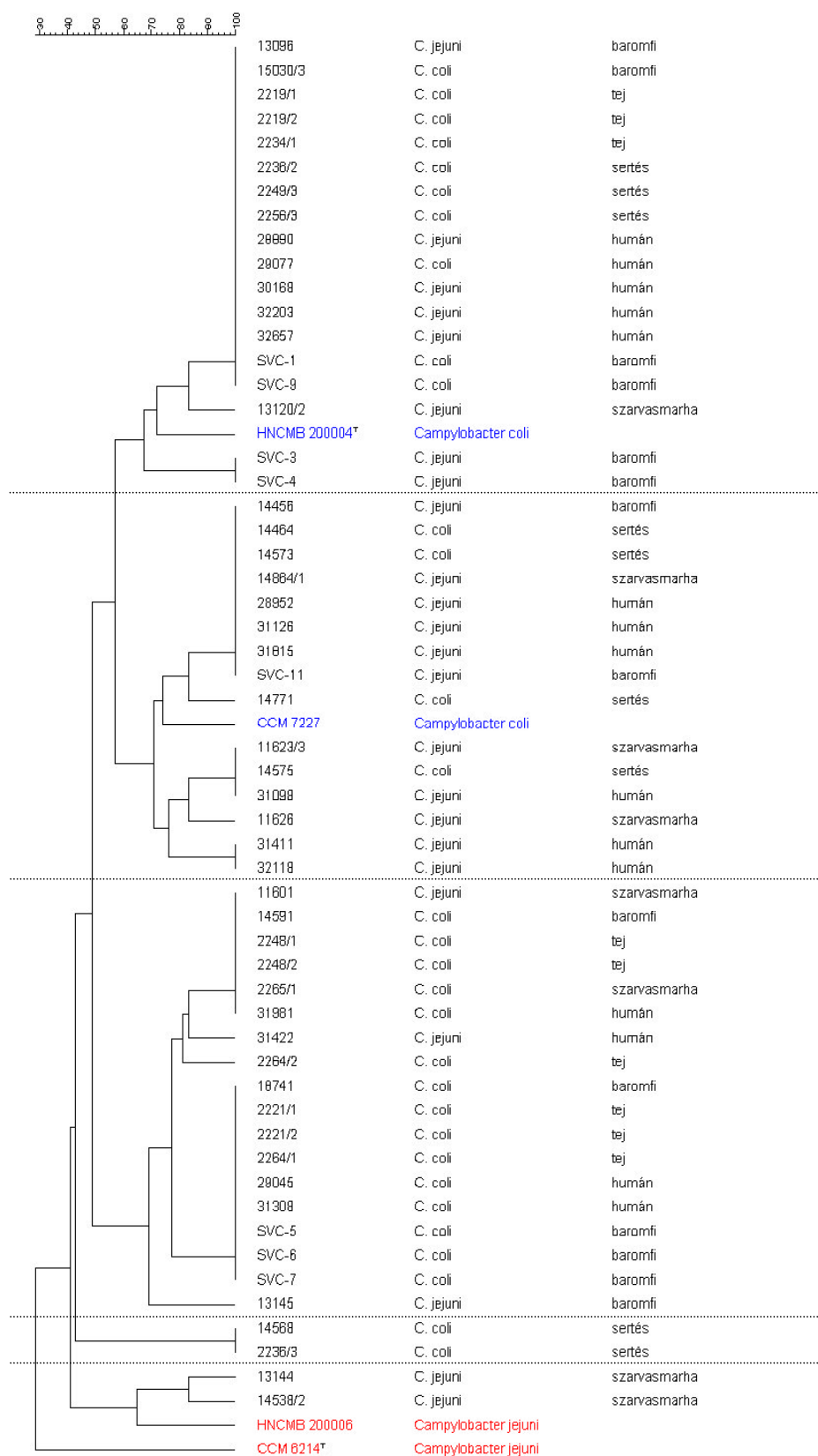
22. ábra: *Campylobacter* izolátumok heteroduplex mobilitási vizsgálata során kapott mintázatok a *Campylobacter coli* CCM 7227 (A) és a *Campylobacter jejuni* CCM 6214^T (B) törzsekkel való hibridizálás esetén

(*C. coli* izolátumok kék színnel, a *C. jejuni* törzsek piros színnel kiemelve)

Az izolátumok többsége mind a *C. coli*, mind pedig a *C. jejuni* törzsgyűjteményi törzsszel képzett heteroduplexeket, azonban a molekulák mozgékonyságában lényeges eltéréseket tapasztaltam. A *C. jejuni* törzs esetében számos heteroduplex molekula a homoduplexekkel közel azonos elektroforetikus mobilitással rendelkezett, amely a nagyfokú szekvencia hasonlósággal magyarázható. Ezekben az esetekben ugyanis a keletkezett heteroduplex molekulákban csak néhány olyan bázis található, amelyek között a hidrogén hidak nem tudtak létrejönni, ezért konformációjukban csak kismértékű változás jött létre, amelynek következtében ezek a heteroduplexek a poliakrilamid gélen a homoduplexek közelében helyezkedtek el. Az izolátumok specifikus primerekkel felszaporított szakaszának *C. coli* törzsgyűjteményi (CCM) törzsből származó DNS-sel való hibridizálása során olyan heteroduplex molekulák jöttek létre, amelyek elektroforetikus mobilitása a DNS szálak között kialakult kisszámú H-híd következtében jelentősen lecsökkent. A 22/A. ábrán körülbelül 500 bázispár magasságban láthatók a homoduplexekhez képest jóval lassabban vándorló heteroduplex molekulák.

A heteroduplex mobilitási vizsgálat eredményeképpen elkészített kombinált dendogram (23. ábra) alapján a vizsgált 55 izolátum 16 egyedi mintázatot mutatott, amelyek öt elkülönülő csoportba voltak sorolhatók. Szinte valamennyi klaszter esetében megfigyelhető, hogy a 100 %-os hasonlósági csoportokba mindkét faj izolátumai egyaránt előfordulnak. Megállapítható tehát, hogy a módszer a vizsgált izolátumok faj szintű elkülönítésére nem alkalmas, azonban a vizsgált rövid DNS darabok szekvencia különbségeinek kimutatása az eljárás segítségével megvalósítható.

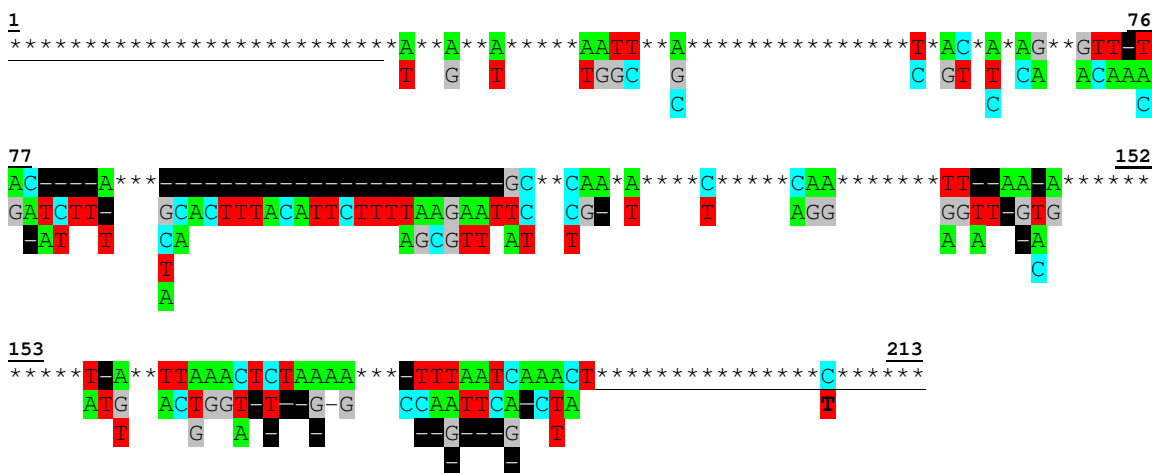
A 11.1 melléklet 35-36. ábráján a két faj izolátumaiból külön-külön elkészített kombinált dendogramok láthatók. A 31 *C. coli* törzs hét elkülönülő klaszterbe tartozik, és megfigyelhető, hogy a 100 % hasonlóságot mutató csoportokba különböző forrásból származó izolátumok találhatóak. A módszer a 24 *C. jejuni* izolátumot 12 klaszterbe sorolta, és ebben az esetben is eltérő eredetű törzsek mutatnak 100 % hasonlóságot egymással.



23. ábra: A *Campylobacter* izolátumok heteroduplex mobilitási vizsgálatának *C. coli* és *C. jejuni* törzsgyűjteményi (CCM) törzssekkel kapott eredménye

5.4.2.5. *A Campylobacter izolátumok flaA – flaB intergénikus régiójának (IGS) szekvencia polimorfizmusa*

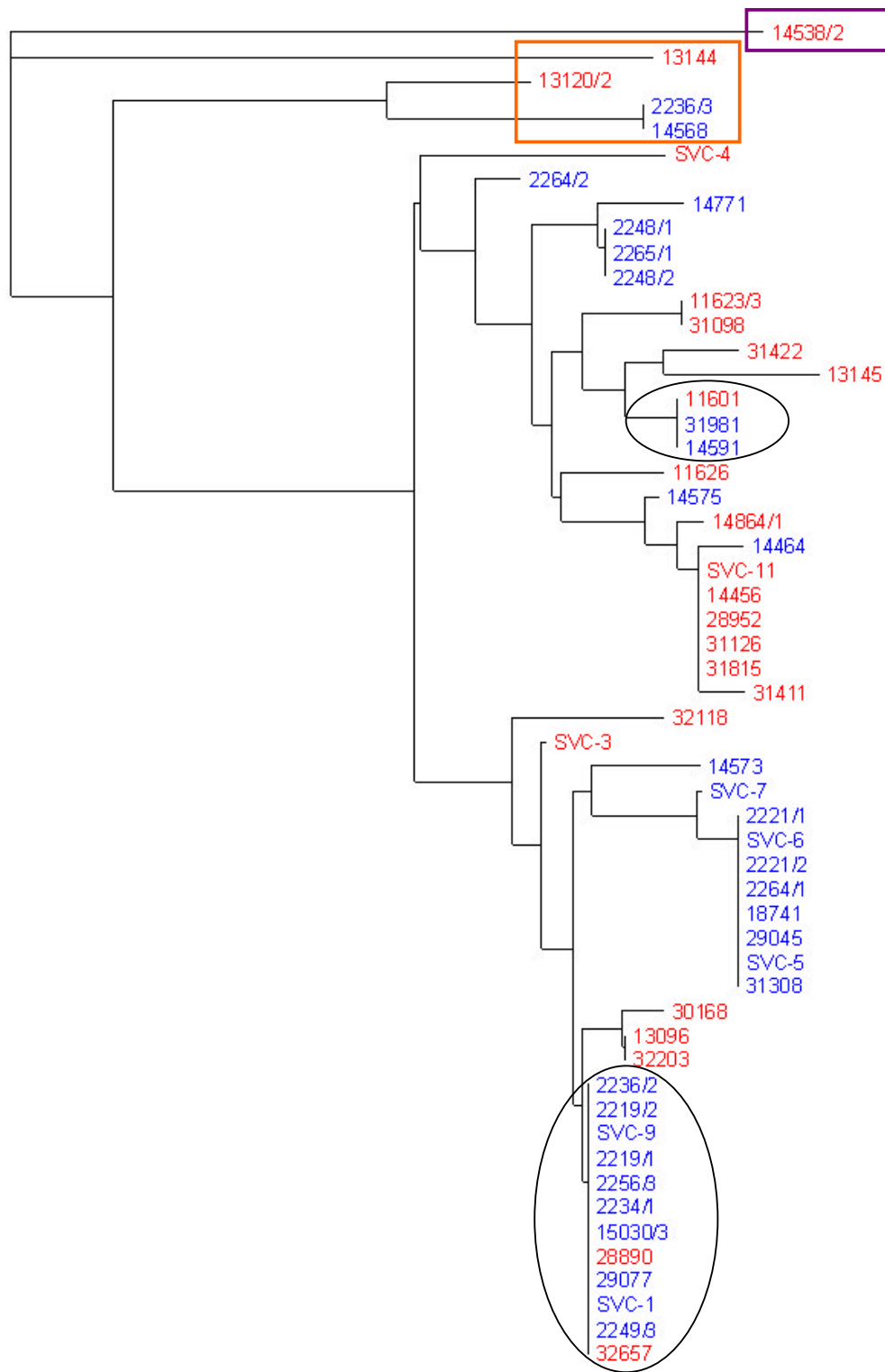
Mivel a vizsgált 55 *Campylobacter* izolátum *flaA – flaB* intergénikus régiójának DGGE és HMA analízise a szekvenciák kiterjedt polimorfizmusára utalt, ezért közvetlen szekvenálással meghatároztam a szekvencia eltéréseket. Az intergénikus szekvenciát a CF03 és CF04 primerekkel amplifikáltam, majd a kapott amplikonokat megszekvenáltattam. Az amplikonok között méretbeli eltérés is megmutatkozott; a legrövidebb, 174 bázisnyi szekvenciával a 14538/2 jelű *C. jejuni*, míg a leghosszabbal (209 bázis) a 14568 és a 2236/3 jelű *C. coli* izolátumok rendelkeztek. A *Campylobacter* izolátumok intergénikus szekvenciájának illesztését követően (11.2 melléklet) megállapítható volt, hogy míg a felszaporításhoz alkalmazott primerek kapcsolódási helyei nagyon konzervatívak, addig a szekvenciákon belül jelentős polimorfizmus tapasztalható. A 24. ábrában foglaltam össze a vizsgált szekvenciák között tapasztalt jelentős különbségeket. Egyes izolátumok esetében nagyobb fokú szekvencia eltérések voltak megfigyelhetők. Három izolátum esetében (14568 - *C. coli*, 2236/3 - *C. coli* és 13120/2 - *C. jejuni*) 24, illetve 25 bázisnyi szekvencia beékelődés volt kimutatható, míg a 13144 jelű *C. jejuni* esetében egy 12 bázisnyi addíciót mutattam ki, a 14538/2 *C. jejuni* intergénikus szekvenciájában pedig egy 15 bázisnyi deléció fordult elő.



24. ábra: A *flaA - flaB* intergénikus szekvenciák bázissorrendjében tapasztalható különbségek a szekvenciák illesztését követően

(csillaggal jelölve azok a bázisok, amelyek valamennyi izolátum intergénikus szekvenciájában megegyeztek, a különbségek esetében azok a bázisok kerültek kiemelésre, amelyek a különböző szekvenciákban eltértek, míg aláhúzással a primerek kötődési helyei vannak kiemelve)

A szekvenálással meghatározott bázissorrendek alapján elkészített filogenetikai fa a vizsgált 55 izolátumot 26 elkülönülő csoportba sorolta (25. ábra). A nagyobb méretű szekvencia beékelődéssel és szekvencia kieséssel jellemzett izolátumok a filogenetikai fában narancssárga, illetve lila keretben láthatók.



25. ábra: A *flaA* és *flaB* gének közti intergénikus szekvencia bázissorrendjén alapuló filogenetikai törzsfa

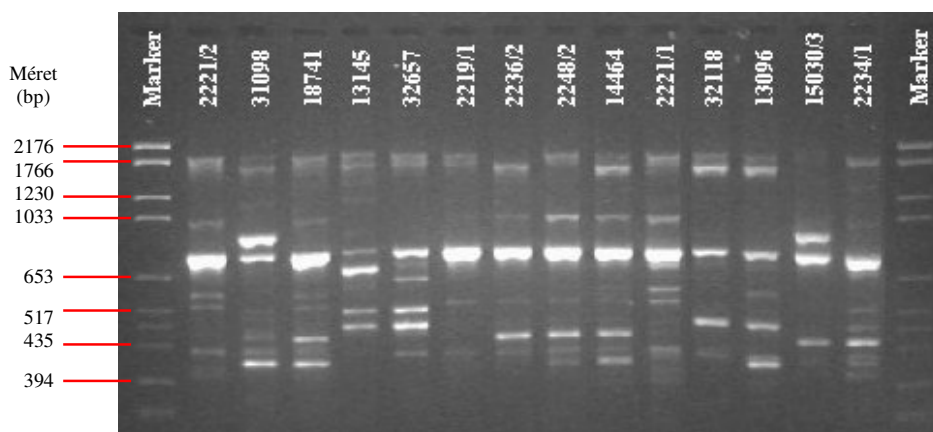
(Piros színnel jelölve a *C. jejuni*, míg kék színnel a *C. coli* izolátumok)

A szekvencia adatok alapján kialakított 26 csoportból két klaszter esetében figyelhető meg, hogy a 100 %-os hasonlóságot mutató izolátumok között *C. coli* és *C. jejuni* fajba tartozó törzsek egyaránt

megtalálhatók (a két csoport fekete színű keretben látható a 25. ábrán). Ezek alapján megállapítható, hogy a *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szekvencia ugyan számos izolátum esetében jelentős polimorfizmust mutat, a két legjelentősebb termofil *Campylobacter* faj (*C. coli* és *C. jejuni*) izolátumainál a szekvencia azonosságok, illetve különbözőségek nem mutattak faji jellemzőket. A szekvencia analízis eredményeit összevetve a DGGE és a heteroduplex mobilitási vizsgálat eredményeivel elmondható, hogy bár az utóbbi két módszer a törzsek tipizálására kevésbé alkalmas (mindkét eljárással kevesebb klaszterbe volt sorolható a vizsgált 55 izolátum), azonban a vizsgált DNS szakaszok közötti különbségek kimutatására megfelelő módszereknek bizonyultak. Mind a DGGE, mind pedig a HMA esetében megfigyelhető (21. és 23. ábra), hogy az azonos bázissorrenddel rendelkező izolátumok ugyanabba a (100 %-os) hasonlósági csoportba tartoztak. Megfigyelhető továbbá, hogy ezekbe a csoportokba esetenként olyan izolátumok is besorolásra kerültek, amelyek szekvenciája eltérést mutatott a csoport többi tagjához képest, rámutatva ezáltal a két módszer kisebb érzékenységére.

5.4.5.6. *Campylobacter* izolátumok tipizálása RAPD-PCR analízissel

A *Campylobacter* izolátumok molekuláris módszerekkel történő vizsgálata során a RAPD-PCR analízishez négy oligonukleotid primert próbáltam ki (OPE15, OPE18, P272 és M13), amelyek közül a P272 esetében számos izolátum nem adott PCR terméket, így az eredmények kiértékelés során az ezzel a primerrel kapott mintázatokat figyelmen kívül hagytam. A másik három primer közül az M13 miniszatellit eredményezte a legtöbb fragmentumot és a legtöbb elkülönülő mintázatot az izolátumok vizsgálata során. Ezekre az eltérő ujjlenyomatokra látható példa a 26. ábrán.

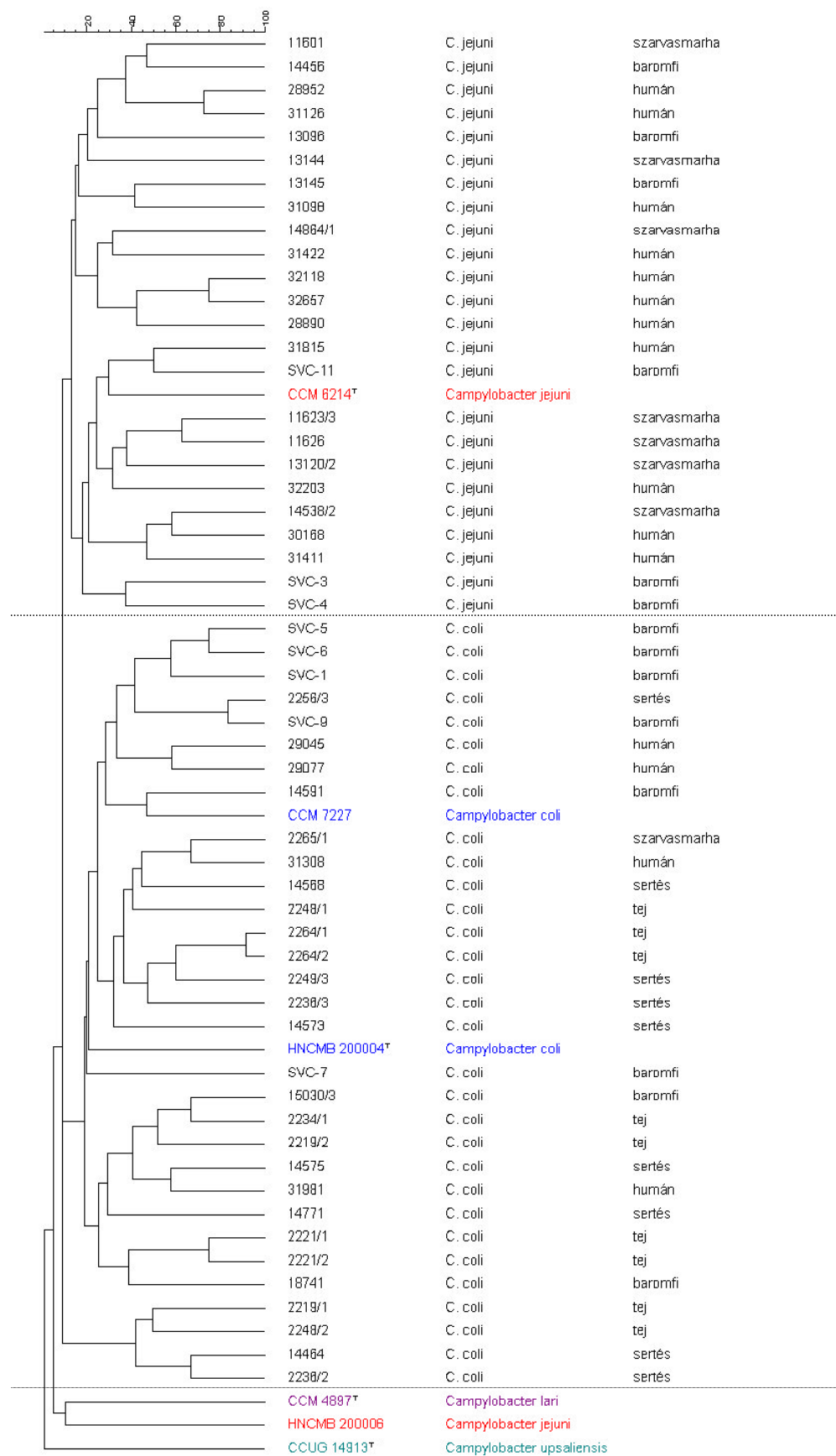


26. ábra: A *Campylobacter* izolátumok RAPD-PCR analízisének eredményei M13-as miniszatellit primerrel

C. coli izolátumok: 2221/2, 18741, 2219/1, 2236/2, 2248/2, 14464, 2221/1, 15030/3, 2234/1; *C. jejuni* izolátumok: 31098, 13145, 32657, 32118, 13096

A három primerrel kapott mintázatok alapján elkészítettem az izolátumok kombinált dendogramját (27. ábra), amely alapján jól látható, hogy az eljárás segítségével a vizsgált izolátumok két nagy csoportra oszthatók. Az első csoportba a *Campylobacter jejuni*, míg a másodikba a *C. coli* fajhoz tartozó izolátumok tartoznak. A csoportokon belül az izolátumok további, kisebb hasonlósági csoportokra oszthatók, amelyek 20 % körüli hasonlósági szint mellett váltak el egymástól. A vizsgált izolátumok között összesen 55 (a törzsgyűjteményi törzsekkel együtt 59) egyedi mintázatot lehetett megfigyelni.

Az izolátumok fajoként elkülönülő kombinált dendogramjai a 11.1 melléklet 37. és 38. ábráin láthatók. Valamennyi *C. coli* és *C. jejuni* izolátum egyedi mintázatot mutatott a három primer kombinálásával elkészített törzsfa alapján. Még azok az izolátumok is más-más törzsekhez tartoznak a fajokon belül, amelyek ugyanabból a mintából, ugyanabban az időpontban kerültek izolálásra (például a tejből izolált 2219/1 és 2219/2 *C. coli* törzsek).



27. ábra: Az izolátumok RAPD-PCR analízise során három primerrel kapott kombinált dendrogramja

5.4.5.7. A PCR alapú molekuláris módszerek összehasonlítása diszkriminációs képességük alapján

A hat PCR-alapú molekuláris módszer tipizálási célra való alkalmazhatóságának összehasonlítása érdekében valamennyi eljárás esetében meghatároztam a Simpson-féle diverzitási indexet („1-D”) az összes izolátum együttes, valamint a két faj izolátumainak külön-külön történő vizsgálata során. Az így meghatározott diverzitási indexeket a 24-25. táblázatokban tüntettem fel. Egy módszer diszkriminatív tulajdonsága abban az esetben tekinthető jónak, ha az „1-D” értéke 1-hez közelít.

24. táblázat: Az alkalmazott molekuláris módszerek diszkriminatív tulajdonságának összehasonlítása a Simpson-féle diverzitási értékek alapján az összes törzs együttes vizsgálata esetén

Jellemzők	rDNS-RFLP	<i>flaA</i> -RFLP	<i>fla</i> -IGS-DGGE	<i>fla</i> -IGS-HMA	<i>fla</i> -IGS-ST*	RAPD-PCR
Diverzitási index („1-D”)	0,141	0,989	0,859	0,872	0,924	1

*szekvencia tipizálás

Az izolátumok együttes vizsgálata során meghatározott diverzitási értékek alapján elmondható, hogy az rDNS-RFLP vizsgálat esetében az „1-D” érték nagyon alacsony (0,1 körüli érték), míg a többi eljárás diverzitási indexe közelebb áll az 1-hez. A legmagasabb értéket a RAPD-PCR analízis esetében kaptam, amelytől a flagellint kódoló *flaA* gén RFLP vizsgálatának diverzitási indexe csak kismértékben tért el. A *fla*-IGS szekvencia tipizálás szintén jelentős mértékű elkülönítést tett lehetővé, míg a *fla*-IGS-HMA és a *fla*-IGS-DGGE „1-D” értékei már alacsonyabbnak bizonyultak, jelezve ezáltal a módszerek kevésbé diszkriminatív tulajdonságát.

25. táblázat: A Simpson-féle diverzitási értékek a két faj törzseinek külön-külön történő vizsgálata során

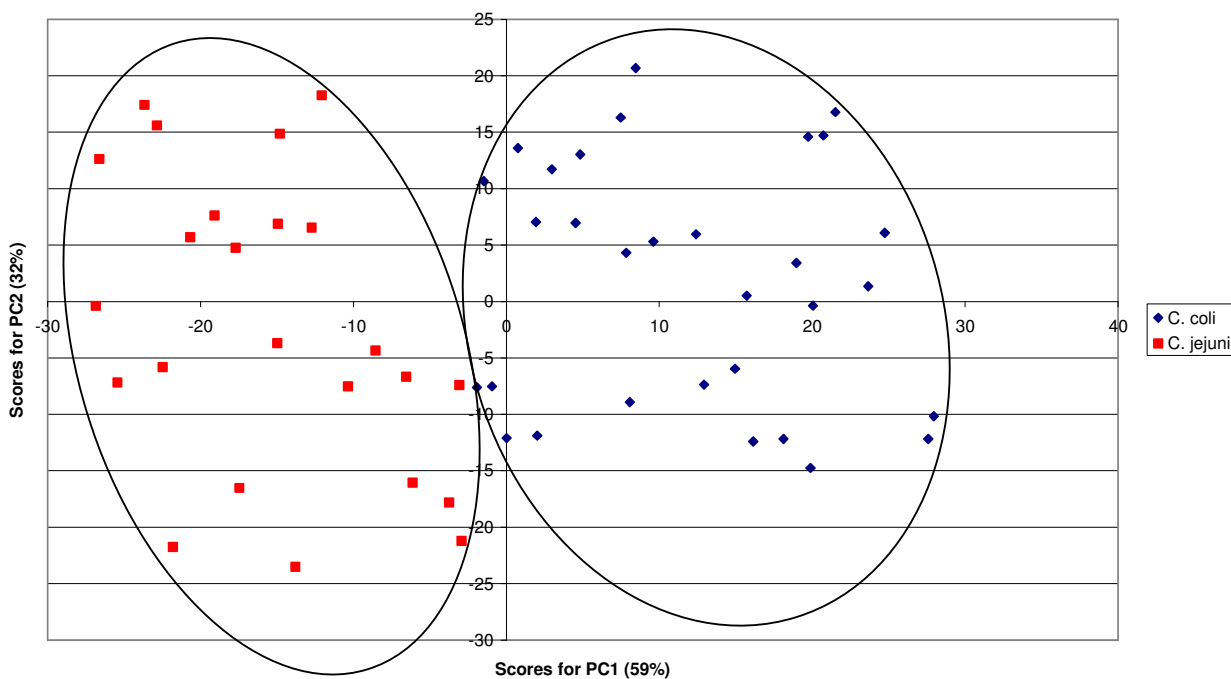
Jellemzők	Faj	rDNS-RFLP	<i>flaA</i> -RFLP	<i>fla</i> -IGS-DGGE	<i>fla</i> -IGS-HMA	<i>fla</i> -IGS-ST	RAPD-PCR
Diverzitási index („1-D”)	<i>C. coli</i>	0,127	0,972	0,804	0,796	0,832	1
	<i>C. jejuni</i>	0,163	0,993	0,895	0,899	0,953	1

A diverzitási indexeket külön-külön meghatározva az egyes fajok izolátumainak vizsgálata során megfigyelhető, hogy a *C. jejuni* faj törzsei esetében jobb diverzitási index értékeket kaptam, mint a *C. coli* törzseknél, így a módszerek a *C. jejuni* fajba tartozó izolátumok tipizálása esetén nagyobb mértékű elkülönítést tesznek lehetővé. A RAPD-PCR analízis „1-D” értéke mindkét faj esetében 1

volt, tehát ez a módszer mutatkozott a leginkább diszkriminatívnak az izolátumok fajonkénti vizsgálatánál.

5.4.5.8. A molekuláris módszerek eredményeinek statisztikai értékelése

Az izolátumok rDNS-RFLP, *flaA*-RFLP, *fla*-IGS-DGGE, *fla*-IGS-HMA és RAPD-PCR módszerekkel történő vizsgálatainak statisztikai kiértékeléséhez főkomponens analízist alkalmaztam, amelynek eredménye a 28. ábrán látható.



28. ábra: Az izolátumok minőségpontjainak elhelyezkedése az első és második főkomponens által meghatározott vetítési síkon

A főkomponens analízis eredménye alapján megállapítható, hogy az 55 izolátum a vizsgált öt módszerrel faj szinten jól elkülönült egymástól. Az izolátumok ugyanis két elkülönülő csoportba (*C. coli* és *C. jejuni*) voltak sorolhatók abban az esetben, ha az öt módszerrel kapott eredményeket együttesen vettem figyelembe.

6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A szelektív dúsítás hatása termofil *Campylobacter* törzsekre

Az élelmiszerekben viszonylag kis számban megtalálható patogén baktériumok, mint például a termofil *Campylobacter* fajok kimutatása esetén szükséges egy előzetes dúsítás, amelyhez különböző szelektív adalékanyagokat tartalmazó dúsító folyadékokat alkalmaznak (Gharst et al., 2006). Ezek az adalékanyagok szelektíven gátolják a nemkívánatos mikrobákat a kimutatni kívánt baktériumokkal szemben. A dúsítás során azonban a különböző feldúsítandó fajok esetlegesen eltérő módon szaporodhatnak, amely eredményeként bizonyos fajok vagy törzsek visszaszorulhatnak, így előfordulhat, hogy a későbbi, szelektív táptalajon történő kimutatás során a vizsgált nagyon kicsi (például oltókacsnyi) mintamennyiségben már meg sem jelennek. Rönner és munkatársai (2004) humán, valamint baromfi eredetű *Campylobacter* törzsek vizsgálata során megfigyelték, hogy az azonosított izolátumok jelentős része a *C. jejuni* fajba tartozott. Hasonló megfigyeléseket tettek Gharst és munkatársai (2006) szarvasmarha eredetű *Campylobacter* izolátumok azonosítása során. Egy másik kutatócsoport azt is megfigyelte, hogy a dúsítás során egyes *C. jejuni* törzsek jobban szaporodnak, mint a faj más törzsei (Newell et al., 2001), azonban az egyes fajok közötti kompetíciót részletesebben eddig még nem tanulmányozták.

Munkám során a szabványos vizsgálatokhoz javasolt Bolton szelektív dúsító folyadékot alkalmazva a *C. coli* és a *C. jejuni* fajba tartozó különböző törzsek együttes dúsítása során vizsgáltam az izolátumok egymáshoz viszonyított szaporodási képességét az ISO szabvány szerinti 41,5 °C-os tenyésztést alkalmazva. A dúsítást követően a Bolton szelektív dúsítóba párban oltott *C. coli* és *C. jejuni* izolátumok közül a *C. coli* törzsek az esetek többségében gyorsabban szaporodtak, mint a *C. jejuni* törzsek (túlnőtték ezen izolátumokat), amely megfigyelés számos kombináció (eltérő arányú beoltás) esetében igazolható volt. A *C. jejuni* csak abban az esetben volt jelentősebb arányban kimutatható a dúsítás végén, ha a *C. coli*-hoz képest jóval nagyobb mennyiségű sejttel történt a beoltás. Eredményeim alapján elmondható, hogy a *C. coli* és *C. jejuni* arányok a dúsítás előtt és a dúsítást követően jelentősen eltértek, mivel az egyes kombinációk esetében a Student-féle t-teszt eredményei szerint a „p” valószínűségi értékek kisebbek voltak, mint 0,05.

Mivel az élelmiszer és egyéb minták esetében csupán öt vagy annál kevesebb telep visszaizolálása történik a szelektív agarokról (EN ISO 10272-1:2006), vizsgálati eredményeim azt mutatják, hogy egy kevert tenyészetet (*C. jejuni*-t és *C. coli*-t egyaránt) tartalmazó minta esetén a *C. coli* nagyobb

valószínűséggel lesz kimutatható, mint a *C. jejuni*. Így az élelmiszerminták feldolgozása során szelektív dúsítást alkalmazva következtetéseink a domináns *Campylobacter* fajt tekintve helytelenek lehetnek, ezért a minta feldolgozás során a szelektív agarra történő szélesztés mellett egyéb, közvetlen módszerek (például PCR-alapú eljárások) alkalmazása is javasolt.

Annak ellenére, hogy megfigyeléseim alapján a *C. coli* és *C. jejuni* törzseket egyaránt tartalmazó kevert tenyészetekből a *C. coli* faj tagjai nagyobb valószínűséggel lesznek kimutathatók a *C. jejuni* törzsekhez képest, számos vizsgálat eredménye azt mutatja, hogy az élelmiszer- és egyéb minták esetében a *C. jejuni* a domináns faj (Møller Nielsen és Ladefoged Nielsen; 1999; Obiri-Danso et al., 2001; Whyte et al., 2004). Ennek egyik magyarázata lehet a Thomas és munkatársai (1999) által is leírtak, miszerint stressz hatására (például különböző hőmérsékletek) a négy vizsgált termofil *Campylobacter* faj közül (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* és *C. upsaliensis*) a *C. jejuni* és *C. lari* törzsek bizonyultak leginkább ellenállónak, míg a másik két faj túlélése kisebb volt. A termofil *Campylobacter* fajok túlélését a hőmérsékleten túl azonban más tényezők is befolyásolhatják, így például az UV sugárzás is (Obiri-Danso et al., 2001).

6.2. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok azonosítása és tipizálása PCR alapú molekuláris módszerekkel

6.2.1. *Escherichia coli* izolátumok kimutatása és azonosítása duplex PCR módszerrel

Az élelmiszer eredetű patogének egy kiemelkedő csoportját alkotják a Shiga toxint termelő *Escherichia coli* törzsek, amelyek különböző, súlyos megbetegedések kialakulásáért felelősek (Hornitzky et al., 2002). A STEC csoporton belül bizonyos törzsek, mint például az O157, az O111, az O26 és az O103 szerotípusba tartozók gyakrabban okoznak humán megbetegedéseket (Paton és Paton, 1998), mint más patogén *E. coli* törzsek, így kimutatásuk és vizsgálatuk az élelmiszerek biztonsága szempontjából lényeges feladat. Az elmúlt néhány évtizedben kifejlesztett molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával a patogének azonosítása és tipizálása könnyen megvalósítható. Számos olyan PCR-alapú módszer került kidolgozásra, amelyek segítségével egyetlen reakcióban, eltérő célszekvenciákra specifikus primerek segítségével mutathatók ki a patogén Shiga toxint termelő *E. coli* törzsek (Franck et al., 1998; Wang et al., 2002; Osek, 2003). A STEC és az O157:H7 szerotípusú törzsek detektálás során gyakori célszekvenciák a Shiga toxint kódoló *stx* gén, az intimin kódoló *eae* gén, valamint az enterohemorrágiás *E. coli* enterohemolizinjét kódoló *hlyA* gén (Fratamico et al., 1995).

Megfelelő minőségű és biztonságos élelmiszerek előállítása céljából olyan duplex PCR módszert dolgoztam ki, amelynek alkalmazása révén lehetőség nyílt a friss fekáliás szennyezettségre utaló *E. coli* detektálása mellett a faj O157:H7 szerotípusú törzseinek kimutatására is. A detektáláshoz olyan, irodalmi adatok alapján kiválasztott PCR primereket (Wang et al., 1997) használtam, amelyek alkalmasak egyrészt az *E. coli* fajba tartozó törzsek (faj-specifikus primer pár), másrészt pedig az O157:H7 szerotípus kimutatására (szerotípus-specifikus primer pár). Az eljárás optimalítása során különböző szerotípusú törzseket vizsgálva azt tapasztaltam, hogy az O157:H7 és O157:H⁻ törzseken kívül egyéb szerotípusok (O26:H11, O103:H2, O111:H⁻, O113:H21) esetében mind a szimplex, mind pedig a duplex PCR reakcióban amplifikációs termék képződött az EHEC O157:H7 törzsekre specifikus primerekkel. Ez a megfigyelés összhangban van a Paton és Paton (1998) által kapott eredményekkel, ugyanis a szerzőpáros munkája során a *hlyA* génre specifikus primer párral nemcsak az O157 szerotípusú törzseknél kapott jelet a PCR reakciót követően, hanem többek között egy O111 és egy O113 törzs esetén is. Meng és munkatársai (1998) megállapították, hogy az általuk vizsgált valamennyi O157:H7 szerotípusú *E. coli* törzs, illetve a nem-O157 EHEC törzsek jelentős hányada is rendelkezik az enterohemolizint kódoló génnel. Megfigyelték továbbá, hogy számos nem-O157:H7 törzs szintén hordozza az EHEC *hlyA* gént. Wang és munkatársai (2001) multiplex PCR reakcióban szintén kimutatták, hogy az O157 szerotípusú törzseken kívül O111, O91 és O128 szerotípusú izolátumok is adtak jelet az enterohemolizin génre specifikus primereket alkalmazva. Stephan és Hoelzle (2000) megállapították, hogy a *hlyA* génnel nem rendelkező STEC törzsek csökkent patogenitást mutathatnak, vagy nem humánpatogének, tehát az enterohemolizint kódoló gén az *E. coli* törzsek egyik jelentős virulencia markere és virulencia faktora (Meng et al., 1998).

A kidolgozott duplex PCR eljárást alkalmaztam baromfihúsról, továbbá baromfihússal, tökehússal és sajttal érintkező felületekről izolált, feltételezeten az *Escherichia coli* fajba tartozó izolátumok azonosításához. Az azonosítás során az izolátumok faji hovatartozása megerősítésre került (valamennyi izolátum esetében keletkezett PCR termék a *malB* génre specifikus, a faj detektálására alkalmas primerekkel), azonban sem O157:H7, sem más olyan szerotípusú törzs nem volt jelen a vizsgált izolátumok között, amelyek amplifikálhatóak lettek volna az enterohemolizinre specifikus primer párral. Az izolált törzsek RAPD-PCR módszerrel történő molekuláris tipizálásának eredménye azt jelzi, hogy a különböző *E. coli* törzsek jelenléte, túlélése és terjedési útvonala igen jelentős.

Bár Magyarországon a verotoxin-termelő *Escherichia coli* törzsek nem jelentenek komoly közegészségügyi problémát (Szeitzné, 2008), kimutatásukra és azonosításukra alkalmas gyors molekuláris biológiai módszerekre szükség van egy esetleges fertőzés során a törzsek gyors és

megbízható detektálása céljából. Kapott eredményeim alapján megállapítható, hogy az enterohemolizint kódoló virulencia plazmidra specifikus primerek segítségével az EHEC *hlyA* gén adott szakasza felszaporítható, ez azonban nem csupán az EHEC O157-es szerocsoport detektálását teszi lehetővé. A kidolgozott duplex PCR módszerrel így az *E. coli* faj kimutatásán kívül az O157:H7 és O157:H⁻ szerotípusú törzsek mellett egyéb, jelentős patogenitással rendelkező, élelmiszer-biztonsági szempontból fontos Shiga toxin-termelő *Escherichia coli* törzsek is detektálhatók.

6.2.2. *Campylobacter* izolátumok vizsgálata PCR-alapú molekuláris biológiai módszerekkel

A termofil kampilobakterek által okozott fertőzések világszerte a legjelentősebb bakteriális enteritist okozó megbetegedések között említhetők annak ellenére, hogy a bejelentett esetek száma kisebb a valódi megbetegedéseknél (Djordjevic et al., 2007). A kampilobakterek által okozott fertőzések több mint 95 %-át a *C. jejuni* fajba tartozó törzsek okozzák (Miller and Mandrell 2006), míg a többi esetért elsősorban *Campylobacter coli* törzsek a felelősek. Az epidemiológiai vizsgálatok során a fertőzés forrásának, illetve terjedési útvonalának felderítése céljából fontos a különböző *Campylobacter* törzsek elkülönítése, így az elmúlt években számos molekuláris tipizálási módszer került kidolgozásra (Wassenaar és Newell, 2000). Ezek az eljárások különbözhetnek időigényükben, költségvonzatukban, reprodukálhatóságukban, valamint az eredmények interpretálásának módjában, továbbá diszkriminációs képességük is eltérhet, így alkalmazhatóságuk megállapítása a különböző *Campylobacter* törzsek jellemzése során lényeges.

Az eltérő forrásból származó *Campylobacter* izolátumok azonosításához és tipizálásához PCR-alapú molekuláris biológiai módszereket alkalmaztam. Az identifikáláshoz olyan specifikus primer párokat alkalmaztam (Linton et al., 1997), amelyekkel a *C. coli* és a *C. jejuni* törzseket egyértelműen el lehetett egymástól különíteni. A vizsgált 55 izolátum 44 %-a (24) a *C. jejuni*, míg 56 %-a (31) a *C. coli* fajba tartozott. Az identifikálás eredménye alapján a humán székletből származó izolátumok többsége (11 izolátum a 15-ből), a szarvasmarha izolátumok nagy része, továbbá baromfihúsról, vagy baromfihússal érintkező felületekről származó izolátumok a *C. jejuni* fajba tartoztak, míg a többi izolátum, köztük a tejből és sertésből származó összes törzs a *C. coli* fajba volt sorolható. Eredményeim alátámasztják Cloak és Fratamico (2002) és Rönner és munkatársai (2004) eredményeit, miszerint sertésekben és sertésfeldolgozó üzemekben a *C. coli*, míg a baromfi eredetű mintákban a *C. jejuni* a domináns faj. A baromfihússal érintkező felületekről izolált *Campylobacter* törzsek vizsgálata során megfigyelhető volt, hogy a korábban patogénnel

szennyezett felület fertőtlenítése után a mikroba jelenléte továbbra is kimutatható volt, ami arra enged következtetni, hogy a megfelelő tisztítási és fertőtlenítési folyamat hiányában a kampilobakterek túlélhetnek a felületen és potenciális veszélyt jelenthetnek a fogyasztó egészségére.

Evolúciós kapcsolatok felderítésére gyakran alkalmazzák a 16S rRNS-t kódoló géneket, ugyanis azok a törzsek, amelyek 16S rDNS génszekvenciája 3 % fölötti eltérést mutat, szinte mindig eltérő fajokba sorolhatók (Stackebrandt és Goebel, 1994). A *C. coli* és *C. jejuni* fajok azonban nem különíthetők el egymástól a 16S rDNS szekvenciák alapján (Cardarelli-Leite et al., 1996; Marshall et al., 1999), aminek oka a két faj 16S riboszómális DNS génjeinek 97 %-nál nagyobb hasonlósága (Gorkiewicz et al., 2003). Vizsgálataim arra irányultak, hogy a variábilis és konzervatív régiók következtében kialakult mozaikos génszerkezet lehetőséget ad-e a *C. coli* és *C. jejuni* törzsek tipizálásra. Ennek megállapítása érdekében 16S rDNS-RFLP módszert alkalmaztam. A faj szinten pontosan meghatározott *Campylobacter* izolátumoknál elvégzett vizsgálat alkalmazásával sem a *C. coli*, sem pedig a *C. jejuni* fajba tartozó törzsek jelentős mértékű elkülönítése nem volt lehetséges. A módszer nagyon gyenge diszkriminációs képességére utal az alacsony, 0,141-es Simpson-féle diverzitási index is. A genomban három kópiában megtalálható rRNS operon (Parkhill et al, 2000) 16S rDNS génjeinek PCR-RFLP vizsgálata tehát nem alkalmas a *Campylobacter jejuni* és *C. coli* törzsek molekuláris jellemzésére. Eyers és munkatársai (1993) a termofil *Campylobacter* fajok 23S rDNS-ére tervezett primerek segítségével elkülönítették egymástól a *C. coli* és *C. jejuni* fajokat, azonban a szekvencia tipizálásra való alkalmazhatóságát nem vizsgálták. Iriarte és Owen (1996) a *Campylobacter jejuni* faj 23S rRNS génjének tipizálásra való alkalmazhatóságát vizsgálta. Megállapították, hogy míg a nagy riboszóma alegységet kódoló gén fajspecifikus jellemzőkkel rendelkezik, addig a *Campylobacter jejuni* törzsek fajon belüli elkülönítését nem teszi lehetővé.

A mozgás a poláris flagellumok révén nélkülözhetetlenek a *Campylobacter* fajok kolonizációjához (Morooka et al., 1985), így a flagellum a kampilobakterek egyik jelentős virulencia tényezője. A *C. jejuni* és *C. coli* törzsek flagellin génjeinek (*flaA* és *flaB*) bizonyos szakaszai igen konzervatívak, míg más régiói nagy variabilitást mutatnak, így a flagellin fehérjét kódoló gének – elsősorban a *flaA* gén – vizsgálata elterjedt és ezzel kapcsolatos publikációkra a szakirodalomban számos példa található (Alm, 1993b; Ayling et al., 1996; Chen és Stern, 2001; Etras et al., 2004; Acik és Cetinkaya, 2006; Djordjevic et al., 2007). A különböző forrásokból származó 55 *Campylobacter* izolátum *flaA*-RFLP molekuláris tipizálása során három restrikciós endonukleázt (*DdeI*, a *HhaI* és az *AluI*) találtam alkalmasnak a PCR során felszaporított DNS szakaszok hasítására, amelyek közül a *DdeI* adta a legjobb elkülönítési specifikusságot. Eredményeim alátámasztják Ayling és

munkatársai (1996) megfigyeléseit a *DdeI* restrikciós endonukleázzal kapcsolatban. A *flaA*-RFLP módszer azonban nem tette lehetővé a vizsgált *Campylobacter* izolátumok faj szinten történő elkülönítését, továbbá megfigyelhető volt, hogy egyes *C. jejuni* és *C. coli* izolátumok három enzimmel kapott hasítási mintázata teljesen megegyezett. Bár a szakirodalomban fellelhető adatok alapján ugyanazon faj törzseinek elkülönítéséhez elegendő csupán egy vagy két restrikciós endonukleázt alkalmazása (Thomas et al., 1997; Djordjevic et al., 2007), ennél több enzim használata ritka (Nishura et al., 1996). A két faj törzseink együttes vizsgálata esetén azonban a módszer diszkriminációs képességének fokozása érdekében szükséges a feloldóképesség növelése más enzim vagy enzimek alkalmazása révén. Az eljárás az izolátumok törzs szinten való elkülönítésre alkalmasnak bizonyult, amelyre igen nagy, 0,989-es diverzitási indexe is utal. A *flaA*-RFLP módszerről Djordjevic és munkatársai (2007) *Campylobacter jejuni* izolátumokat vizsgálva megállapították, hogy az eljárás a multilókusz szekvencia tipizálás (MLST) eredményeivel összhangban lévő eredményeket adott, így a restrikciós hasításon alapuló, kevésbé költség- és időigényes módszer rutin vizsgálatokban az MLST alternatívájaként is alkalmazható.

Campylobacter izolátumok azonosítására és tipizálására a *flaA* génen kívül más szekvenciák is alkalmasak, és ezek vizsgálatára számos egyéb eljárás is kidolgozásra került. A jelentős heterogenitással jellemezhető flagellin gének közötti intragénikus szekvencián (Thornton et al., 1990) alapuló specifikus PCR-es detektálási eljárást dolgozott ki Wegmüller munkatársaival együtt (1993), míg ugyanezen szekvencia denaturáló gradiens gélelektroforetikus vizsgálatát végezték el Hein és munkatársai (2003). Najdenskiék (2008) a *flaA* gén vizsgálatán alapuló tenyésztéstől független DGGE módszert alkalmaztak broilerek vékonybél mintájából *C. coli* és *C. jejuni* törzsek kimutatására. A munkám során vizsgált *Campylobacter* izolátumok elkülönítéséhez 20-40 %-os denaturáló komponens koncentráció bizonyult alkalmasnak merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézis során. A módszer bár munkaigényes és a vizsgálható célszekvencia mérete is korlátozott (Green, 2005), a párhuzamos DGGE módszer alkalmasnak bizonyult az izolátumok csoportosítására a *flaA* és *flaB* gének közti mintegy 180-200 bázispár hosszúságú intergénikus szekvenciában tapasztalható nukleotidbázisok eltérése alapján. Eredményeim szerint a vizsgált DNS szakasz szekvencia polimorfizmusa nem mutat faji jellemzőket, ezért identifikálásra nem alkalmas, amely megfigyelés alátámasztja a Studer és munkatársai (1998) által kapott eredményeket. Törzsek közötti különbségek kimutatására, azaz tipizálásra azonban alkalmas lehet, amire még elfogadható, 0,859-es diverzitási indexe is utal. Hein és munkatársai (2003) a *fla*-DGGE módszert *C. jejuni* izolátumok esetében szintén jól használható tipizálási eljárásnak találták, azonban *C. coli* törzsek esetében nem határozták meg a módszer diszkriminatív képességét. Az eljárás hatékonyságát összehasonlítva a *flaA*-RFLP módszerrel megállapítható, hogy a *fla*-DGGE kevésbé diszkriminatív

technika. Ez a megfigyelés összhangban van a Nielsen és munkatársai (2000), valamint Hein és munkatársai (2003) által kapott eredményekkel Figyelembe kell azonban venni, hogy míg a restriktációs vizsgálat a teljes flagellin génre vonatkozik, addig a DGGE a *flaA* gén 3' régiójának, valamint a *flaA* és *flaB* intergénikus szekvencia egy bizonyos részének analízisén alapszik.

A *Campylobacter* izolátumok *flaA-flaB* intergénikus szekvenciájának heteroduplex mobilitási analízissel történő vizsgálata során a PCR-rel felszaporított DNS szakaszok denaturálását, majd a típus/referencia törzsekkel való hibridizálását követően létrejött homo- és heteroduplex molekulák elektroforetikus mobilitása alapján megállapítható, hogy szinte valamennyi izolátum képzett heteroduplex molekulákat, ami a vizsgált, mintegy 180-200 bázispár hosszúságú DNS darabok szekvencia polimorfizmusára utal. A munkám során vizsgált *Campylobacter* izolátumok esetében a heteroduplex analízis Simpson-féle diverzitási indexe 0,872 volt, amely tükrözi a módszer esetleges alkalmazhatóságát az egyes törzsek jellemzésére, faj alatti elkülönítésére, azonban az eljárás faji azonosításra szintén nem alkalmas. A kapott eredményeket összevetve a *flaA*-RFLP vizsgálat eredményeivel megállapítható, hogy a két módszer diszkriminációs képessége jelentős eltérést mutat, ami a DGGE vizsgálathoz hasonlóan magyarázható a vizsgált szekvenciák jelentős méretbeli különbségével (1700 illetve 200 bázispár). A heteroduplex analízist korábban többek között *Salmonella* (Jensen és Hubner, 1996), *Mycobacterium* (Mohamed et al., 2004) és vírusok (De Mendonca et al., 2008) esetében is alkalmas eljárásnak találták tipizálási célra, azonban *Campylobacter* izolátumok vizsgálatára eddig még nem alkalmazták. Ezért a vizsgált izolátumok esetében fontosnak tartottam a *flaA-flaB* intergénikus szekvenciák bázissorrendjének pontos meghatározását, és az így kapott eredmények, valamint a heteroduplex vizsgálatok eredményeinek összevetését.

A *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szakasz bázissorrendjének szekvenálással történő vizsgálata során kapott eredményeimet összehasonlítva a HMA és a DGGE módszerekkel kapott eredményeimmel megfigyelhető, hogy bár mindkét eljárás alkalmas volt az azonos szekvenciájú izolátumokat 100 %-os hasonlósági csoportokba sorolni, néhány eltérő bázissorrenddel rendelkező izolátumot is ezekbe a klaszterekbe csoportosítottak. Ez mindkét technika esetében megfigyelhető volt, így megállapítható, hogy a módszerek kisebb fokú diszkriminációs képességgel rendelkeznek, mint a direkt szekvenálás. A bázissorrend meghatározás eredményei továbbá azt is tükrözik, hogy bár az intergénikus szekvenciát igen variábilis régióknak tekintik, ezen DNS szakasz vizsgálata nem alkalmas a *C. coli* és *C. jejuni* törzsek faj szintű elkülönítésére, amely megfigyelés alátámasztja Studer és munkatársai (1998) eredményeit. A két módszer – a heteroduplex mobilitási vizsgálat és a

denaturáló gradiens gélelektroforézis – ezen megfigyelések alapján rövidebb génszakaszok közötti szekvencia különbségek kimutatására jól alkalmazható, tipizálásra azonban csak korlátozottan.

A véletlenszerűen felszaporított polimorfikus DNS vizsgálatot (RAPD analízist) régóta alkalmazzák mikroorganizmusok jellemzésére (Williams et al., 1990), így kampilobakterek esetében is fellelhetők az irodalomban olyan publikációk, amelyekben tipizálásra alkalmas módszernek találták a RAPD-PCR analízist (Mazurier et al., 1992; Madden et al., 1996). Az 55 *Campylobacter* izolátummal elvégzett RAPD vizsgálat során a kiválasztott primereket egyedül alkalmazva az esetek többségében különböző mintázatokat kaptam az eltérő fajhoz tartozó izolátumok esetében, azonban a két faj elkülönítésére nem nyílt lehetőség csupán egyetlen indító szekvenciát alkalmazva. Legalább két RAPD primer volt szükséges a *Campylobacter* izolátumok kellő hatékonyságú elkülönítéséhez, azonban több indító szekvencia alkalmazása esetén biztosabban lehet meghatározni a törzsek közötti klonális kapcsolatokat. Az általam kiválasztott három primer (OPE15, OPE18 és M13) együttes alkalmazása esetén lehetőség nyílt a *Campylobacter* fajok egyértelmű elkülönítésére is. Fitzgerald és Swaminathan (2003) kampilobakterek esetén a RAPD analízist egyszerű, gyors és alacsony költségvonzattal járó módszerként írták le, az eljárás hátrányaként azonban megemlítették kevésbé jó reprodukálhatóságát, átlagos diszkriminációs képességét és az eredmények bonyolult kiértékelését. Vizsgálataim alapján az eljárással kapott eredmények (molekuláris ujjlenyomatok) jól ismételhetőnek bizonyultak, továbbá a három primerrel elvégzett RAPD analízis diszkriminációs képessége bizonyult a legjobbnak az alkalmazott módszerek közül, és bár az eredmények értékelése (a molekuláris ujjlenyomatok kiértékelése) valóban nehezebb a többi módszerhez képest, epidemiológiai vizsgálati célokra mégis megfelelő eljárásnak tekinthető.

A vizsgált két faj izolátumaira külön-külön meghatározva az egyes eljárások diszkriminatív képességét megállapítható, hogy mindkét esetben a RAPD-PCR analízis bizonyult a legjobb módszernek a törzsek tipizálására. A másik öt eljárás esetében megfigyelhető volt, hogy a *C. jejuni* törzsek esetében mindig nagyobb diszkriminációs indexeket kaptam, ami a *C. jejuni* faj törzseinek nagyobb genetikai variabilitására is utalhat.

A flagellin A gén restrikciós fragmentumhossz (*flaA*-RFLP) vizsgálatán alapuló módszer nagyobb diszkriminációs képességgel rendelkezett az rDNS-RFLP, a *fla*-IGS-DGGE és a *fla*-IGS-HMA eljárásokhoz viszonyítva, így valamennyi szempontot (idő, költség, könnyű kivitelezhetőség, ismételhetőség, valamint az eredmények értékelhetősége) figyelembe véve *Campylobacter* izolátumok tipizálására és epidemiológiai vizsgálatára ezt a módszert javasolnám. Mivel azonban a *flaA*-RFLP módszerrel kapott eltérő mintázatok a restrikciós endonukleázok felismerő és hasító

helyeinek eltérése alapján jöttek létre, és nem utalnak a szekvenciák közötti eltérésekre, így a génszekvenciák közötti polimorfizmus megállapítására a direkt szekvenálás lehetséges alternatívájaként a HMA és DGGE módszerek javasolhatók.

Tudomásom szerint a szakirodalmakban nem lelhetők fel olyan adatok, amelyek szerint hazai forrásokból származó *Campylobacter* izolátumok tipizálását több különböző PCR-alapú molekuláris biológiai módszerrel korábban elvégezték volna, így a munkám során kapott eredmények a magyarországi *Campylobacter jejuni* és *C. coli* fajba tartozó törzsek jellemzésére vonatkozóan újdonságnak tekinthetők.

6.3. Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei

Az élelmiszer-biztonsági, valamint az élelmiszer-higiéniai szempontból jelentős baktériumok élelmiszerekből történő kimutatása hagyományos módszerekkel mind a mai napig nagyon lényeges, mivel a polimeráz láncreakción alapuló detektálási módszerek érzékenysége általában nem éri el a kívánt kimutatási határértéket, továbbá a PCR-es kimutatás során az élő és a holt sejtek egyaránt detektálásra kerülnek. Ugyanakkor azonban hatalmas fejlődést hozott az élelmiszer eredetű patogének kimutatásában a PCR technika, mivel dúsítás után nagyon rövid idő alatt megbízható eredményekhez vezet. Az alacsony infekciós dózissal jellemezhető termofil *Campylobacter* fajok kimutatása egy komplex élelmiszer mátrixból vagy egy klinikai mintából versengő mikrobióta mellett is megvalósítható szelektív dúsítás folyamán. Az epidemiológiai és zoonózis vizsgálatok szempontjából azonban nem lényegtelen, hogy egy mintából, amely *C. coli* és *C. jejuni* törzseket egyaránt tartalmaz, melyik faj lesz kimutatható abban az esetben, ha a feltételezett alacsony sejtszám miatt szelektív dúsítást kell alkalmazni. A dolgozatomban bemutatott munka folytatásaként további kísérleteket elvégezve élelmiszerminták, illetve a kompetitív mikrobióta és más *C. jejuni/C. coli* törzsek bevonásával a jelenség 'in vivo' körülmények közötti előfordulását is érdemes lenne megvizsgálni.

Az enterohemorrágiás *E. coli* (EHEC) törzsek közül elsősorban az O157:H7 és az O157:H⁻ szerotípusú törzsek azonosítása az általuk okozott igen súlyos megbetegedések miatt igen jelentős. Az *Escherichia coli* faj, valamint az EHEC és egyes Shiga toxin-termelő *E. coli* (STEC) törzsek detektálására kidolgozott duplex PCR módszer alkalmazása az iparban és a diagnosztikai laboratóriumokban egyaránt nagy előnyt jelenthet a termékek friss, fekáliás szennyezettségének kimutatása, illetve élelmiszer-biztonsági szempontból történő megítélése szempontjából. Mivel az EHEC törzsek infekciós dózisa kicsi és az élelmiszer esetleges fertőzöttsége nagy veszélyt jelent a

fogyasztóra nézve, ezért különösen fontos az élelmiszer fertőzöttségének vagy patogén mentességének gyors és megbízható kimutatása. A vizsgált célszekvenciákra (*malB* és *hlyA*) specifikus próbák tervezésével és az eljárás további optimalizálásával olyan duplex real-time PCR reakciót lehetne kifejleszteni, amelynek segítségével az *E. coli* törzsek detektálása valós időben történhetne meg.

A termofil *Campylobacter* fajok, illetve törzsek azonosítása és tipizálása, valamint terjedési útvonaluk feltérképezése megfelelő molekuláris biológiai módszerekkel fontos feladatunk. Az emberi megbetegedéseket okozó törzsek pontos identifikálása elsősorban a klinikai mikrobiológiában jelentős, mivel a betegség kezelésére alkalmazható antibiotikum típusa függ a kiváltó fajtól. A két faj, valamint a fajok törzseinek elkülönítése továbbá azért is fontos, mert egyes *C. jejuni* törzsek igen súlyos szövődményekkel járó idegrendszeri megbetegedéseket is okozhatnak, míg a *C. coli* törzsek kevésbé hozhatók összefüggésbe súlyos klinikai tünetek kialakításával. Ugyancsak fontos annak pontos feltérképezése, hogy a két faj milyen eredetű élelmiszerekkel kerül be az élelmiszerláncba, mivel így a zoonózisokkal kapcsolatosan is pontosabb információk állnak rendelkezésre, és ez megkönnyíti az ellenük való védekezést. Fontos lenne a két vizsgált termofil *Campylobacter* fajon kívüli egyéb fajok kimutatására hasonlóan megbízható és gyors PCR-alapú technikákat kifejleszteni, mivel ezek hiányában pontos faji identifikálásuk - főként a rutin vizsgálatok esetében – és jellemzésük nehezen valósítható meg.

A dolgozatban bemutatott kifejlesztett vagy továbbfejlesztett módszereknek a kutató munkában és a tájékozódó vizsgálatokban való alkalmazhatósága igazolásra került, azonban annak eldöntésére, hogy a módszerek megfelelő teljesítő képességgel rendelkeznek-e és a rutin mikrobiológiai diagnosztikában megbízhatóan alkalmazhatók lennének-e a módszerek validálására lenne szükség.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- (1) Kidolgoztam az *E. coli* faj és annak O157:H7 szerotípusának együttes kimutatására alkalmas duplex PCR módszert, amelynek során az izolátumok gyors és pontos azonosítását két specifikus primer pár segítségével, egyetlen PCR reakcióban lehet megvalósítani. A módszer segítségével a friss, fekáliás szennyezettségre utaló *E. coli* és az élelmiszer-biztonsági szempontból igen jelentős EHEC (enterohemorrágiás *Escherichia coli*) törzsek mellett néhány szintén fontos STEC (Shiga toxin-termelő *E. coli*) törzs is kimutatható.
- (2) Összehasonlítva különböző *Campylobacter jejuni* és *C. coli* törzsek szaporodási képességét a Bolton féle szelektív dúsítás során megállapítottam, hogy a *C. coli* törzsek a dúsítás alatt az esetek többségében gyorsabban szaporodnak, mint a *C. jejuni* törzsek, ezért az élelmiszervizsgálat során alkalmazott szelektív dúsítást követő faji identifikálás a két faj együttes előfordulása esetén hamis eredményekhez vezethet.
- (3) Az általam vizsgált *Campylobacter* izolátumok *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus nukleotid szekvenciáját összehasonlítva jelentős eltéréseket találtam az egyes törzsek között. Kimutattam, hogy a szekvencia polimorfizmusok mögött egyedi nukleotid eltérések, valamint néhány tíz bázispárnyi inszerciók, illetve deléciók állnak. Ezen intergénikus szekvencia DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) analízise, valamint a korábban még nem alkalmazott heteroduplex mobilitási vizsgálata az izolátumok hasonló szintű elkülönítését tette lehetővé, ami a módszerek megfelelő érzékenysége utal egy adott gén polimorfizmusának vizsgálata esetén.
- (4) A Simpson-féle diverzitási index meghatározásával összehasonlítottam a *Campylobacter coli* és *C. jejuni* izolátumok tipizálására alkalmazható PCR-alapú molekuláris módszereket. Megállapítottam, hogy diszkriminációs képesség szempontjából mindkét faj tipizálására legalkalmasabb eljárás a RAPD-PCR analízis. Ezt követi a *flaA* gén RFLP analízise, amely mind a *C. coli*, mind pedig a *C. jejuni* törzsek tipizálására jól alkalmazható eljárásnak bizonyult. Eredményeim szerint a *fla*-IGS szekvencia tipizálás a *Campylobacter jejuni* esetében kiváló, míg a *C. coli* esetében elfogadható diszkriminációs képességgel rendelkezik, ezért a gyakorlat számára általános tipizálási módszerként javaslom. A *fla*-IGS DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) és *fla*-IGS HMA (heteroduplex mobilitási vizsgálat) eredményezték a legkisebb, azonban a gyakorlat szempontjából még kielégítő diszkriminációs indexet.

(5) A kapott tipizálási eredményeket főkomponens analízissel kiértékelve megállapítottam, hogy annak ellenére, hogy az alkalmazott molekuláris tipizálási módszerek nem eredményeztek a két faj identifikálására alkalmazható specifikus mintázatokat, a főkomponens analízis során a két fajhoz tartozó izolátumok mégis eltérő csoportokba kerültek. Ez azt jelzi, hogy a tipizálás során vizsgált genomszekvenciák alapján az azonos fajhoz tartozó törzsek nagyobb genom szintű hasonlóságot mutatnak egymáshoz képest, mint az eltérő faj törzseihez viszonyítva.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élelmiszer-biztonság kérdése világszerte kiemelt jelentőségű, így a fogyasztók egészségének védelme érdekében fokozott figyelmet kapnak az élelmiszer eredetű patogén baktériumok. Az egyik legsúlyosabb következményekkel járó megbetegedést okozó patogének a Shiga toxint termelő *Escherichia coli* törzsek, amelyek kimutatása az élelmiszerekből fontos feladatunk. Az elmúlt években a *Campylobacter* fajok által okozott élelmiszer eredetű fertőzések előfordulása nagymértékben növekedett, ezért ennek élelmiszer-biztonsági vonatkozásai is kiemelt jelentőségűek. A kampilobakterek okozta fertőzések epidemiológiai hátterét többféle mikrobiológiai módszerrel vizsgálták, azonban a sokféle eltérő azonosítási és tipizálási eljárás ellenére csupán néhány tanulmány foglalkozik a módszerek vizsgálatával és hatékonyságuk összehasonlításával.

Munkám során célul tűztem ki olyan PCR alapú molekuláris biológiai módszer kidolgozását, amelynek segítségével egy lépésben valósítható meg az *E. coli* faj, valamint a faj O157:H7 szerotípusú törzseinek kimutatása. Céлом volt továbbá a két legjelentősebb termofil *Campylobacter* faj (*C. coli* és *C. jejuni*) törzseinek dúsítás során egymáshoz viszonyított szaporodási képességének meghatározása, valamint nagyszámú kampilobakter izolátum segítségével különböző PCR-alapú tipizálási eljárások hatékonyságának meghatározása.

Élelmiszer vizsgálatok során élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumokat izoláltam, köztük 22 *E. coli* törzset is, amelyek molekuláris biológiai vizsgálata során kontroll törzsként nagyszámú, többnyire humán eredetű *E. coli* törzset is bevontam. A duplex PCR módszerrel történő molekuláris identifikáláshoz olyan szakirodalomból választott PCR primereket kombináltam, amelyek alkalmasak lehetnek az *E. coli* fajhoz tartozó és az O157:H7 szerotípusú törzsek egy reakcióban történő detektálására. A módszerfejlesztés során meghatároztam a duplex PCR optimális paramétereit, amelyek segítségével a kontroll törzsek közül egy lépésben sikerült kimutatni az O157:H7 szerotípusú törzseket, illetve néhány, szintén súlyos megbetegedést okozó STEC (Shiga toxin-termelő *Escherichia coli*) törzset. A saját, élelmiszer eredetű izolátumok közül O157:H7 vagy O157:H- szerotípusú törzs nem volt kimutatható, azonban az izolátumok RAPD-PCR módszerrel végzett molekuláris vizsgálatának eredménye azt jelzi, hogy az *E. coli* jelenléte, túlélése és terjedési útvonala igen jelentős.

Szelektív dúsítás során vizsgálva a *Campylobacter jejuni* és a *C. coli* fajba tartozó törzsek szaporodási képességét megfigyeltem, hogy a Bolton szelektív dúsítóba párban oltott *C. coli* és *C. jejuni* izolátumok közül a *C. coli* törzsek a dúsítást követően az esetek túlnyomó többségében gyorsabban szaporodtak, mint a *C. jejuni* törzsek, vagyis képesek voltak túlnőni a *C. jejuni* izolátumokat. A *C. jejuni* csak abban az esetben volt magasabb arányban kimutatható, ha a *C. coli*-hoz képest jóval nagyobb mennyiségű sejttel történt a beoltás. Eredményeim alapján megállapítható, hogy amennyiben egy élelmiszermintát a két faj törzseit egyaránt tartalmazza, a feldolgozás során szelektív dúsítást alkalmazva téves következtetéseket vonhatunk le a domináns fajt tekintve.

A *Campylobacter* izolátumok PCR alapú molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítása, jellemzése és tipizálása során összesen 55 *Campylobacter* nemzetségbe tartozó izolátumot vizsgáltam, amelyek között nyolc élelmiszer vizsgálat során izolált törzs is megtalálható volt. Az izolátumok faji azonosításához specifikus primer párokat alkalmaztam, amelyekkel két fajba tudtam sorolni valamennyi vizsgált törzset; az izolátumok közül 31 a *C. coli*, míg 24 a *C. jejuni* fajba tartozott.

A kampilobakterek tipizálása során hat különböző PCR alapú molekuláris biológiai módszer alkalmazhatóságát vizsgáltam, amelyek a következők voltak: (1) rDNS-RFLP, (2) *flaA*-RFLP, (3) *fla*-IGS DGGE, (4) *fla*-IGS HMA, (5) *fla*-IGS szekvenálás, valamint (6) RAPD-PCR analízis. Az egyes módszerekkel kapott eredményeket kiértékelve dendogramokat (hasonlósági törzsfákat) készítettem, és minden eljárás esetében meghatároztam a módszer diverzitási indexét. A tesztelt eljárások közül a legjobb diszkriminációs képessége a három primerrel elvégzett RAPD-PCR analízisnek volt (1,000), amelynek segítségével valamennyi izolátum külön törzsnek bizonyult. Ezt követte a *flaA*-RFLP módszer (0,989), amely szintén jelentős mértékű elkülönítést tett lehetővé. A flagellin gén intergénikus régiójának szekvencia vizsgálata szintén jó diszkriminációs képességgel rendelkezett (0,924). A *fla*-IGS heteroduplex mobilitási vizsgálat és a *fla*-IGS DGGE módszerek alkalmasnak bizonyultak a törzsek jellemzésére, azonban diverzitási indexük már kisebb (0,872 illetve 0,859) volt az előbb említett eljárásokhoz képest. A 16S rDNS-RFLP módszerrel kapott eredmények alapján megállapítható, hogy ez a technika nem alkalmazható a vizsgált termofil *Campylobacter* izolátumok tipizálására (diverzitási indexe mindössze 0,141 volt). Az öt módszerrel (rDNS-RFLP, *flaA*-RFLP, *fla*-IGS-DGGE, *fla*-IGS-HMA, és RAPD-PCR analízis) kapott eredményeket együttesen figyelembe véve, főkomponens analízissel kiértékelve megállapítható, hogy az azonos fajhoz tartozó törzsek nagyobb genom szintű hasonlóságot mutatnak egymáshoz képest, mint az eltérő faj törzseihez viszonyítva.

A *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szekvencia ugyan számos izolátum esetében jelentős polimorfizmust mutatott, a *C. coli* és *C. jejuni* izolátumok esetében a szekvencia azonosságok, illetve különbségek nem mutattak faji jellemzőket. A szekvencia analízis eredményeit összevetve a *fla*-IGS DGGE és a *fla*-IGS heteroduplex mobilitási vizsgálat eredményeivel megállapítottam, hogy bár a két módszer a törzsek tipizálására kisebb diszkriminációs képességük következtében kevésbé alkalmas, a vizsgált DNS szakaszok közötti különbségek kimutatására azonban megfelelő módszereknek bizonyultak.

Vizsgálataim bizonyították, hogy a molekuláris biológiai módszerek a hagyományos eljárásokhoz képest megbízhatóbb eredményeket adtak, és molekuláris tipizálási módszerek segítségével a patogén mikroorganizmusok útja az élelmiszerláncban nagy biztonsággal nyomonkövethető.

9. SUMMARY

Food safety is one of the most important issues all over the world and food-borne pathogens are major concern in the protection of consumers' health. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains are among bacteria that can cause serious illnesses, thus their detection in foods is one of our important tasks. In the past years incidence of infections caused by different *Campylobacter* species increased, therefore role of these pathogens in food safety have great importance. Epidemiological background of infections caused by campylobacters had been investigated with microbiological methods, however despite the numerous identification and typing techniques only a few studies are dealing with the comparison of effectiveness of these methods.

One of the objectives of my work was the elaboration of a PCR-based molecular biological method for the detection of *E. coli* and its pathogenic O157:H7 serotype in one step. An additional aim was the determination of the effect of selective enrichment on *Campylobacter coli* and *C. jejuni* during co-culturing of their different strains. Another objective of the work was the comparison and determination of the efficiency of different PCR-based typing methods on *Campylobacter* isolates originated from different sources.

During isolation of food-borne pathogenic bacteria twenty two *E. coli* isolates were collected mainly from food-related sources. Before analysing the isolates molecular methods to be applied were optimised with some control strains derived mainly from human origin. Formerly published PCR primers were used for the identification of the isolates by duplex PCR method. One set of the primers was specific for the *E. coli* species, while the other pair of primers was specific for strains of O157:H7 serotype. These sets of primers were combined and during the elaboration of the technique the duplex PCR was optimised. It was possible to detect *E. coli* strains together with *E. coli* O157:H7 and O157:H⁻ strains and some other STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) strains in one step by the application of the developed technique. These pathogenic serotypes were not detected among the food isolates, although results of RAPD-PCR analysis showed that presence, survival and rout of transmission are very important of *Escherichia coli*.

Investigating the ability of *C. jejuni* and *C. coli* to multiply when their strains were inoculated in different ratios into the enrichment broth it can be concluded, that the *C. coli* strains were able to multiply and dominate over *C. jejuni* in Bolton selective enrichment broth. *C. jejuni* cells were isolated in significant proportion only when it constituted a high proportion of the initial inoculum.

These results indicate that if a sample contains mixture of the two species (*C. coli* and *C. jejuni*) our conclusions concerning the dominant species could be false.

Fifty-five *Campylobacter* isolates were identified, characterised and typed by PCR-based molecular methods. Eight of the campylobacters originated from foods were isolated during food hygienic analysis. Identification of the isolates was performed by specific PCR reactions. Based on the result of the reactions thirty one *C. coli* and twenty four *C. jejuni* isolates were identified at species level. For typing of the isolates six different PCR-based molecular methods were used: (1) rDNA-RFLP, (2) *flaA*-RFLP, (3) *fla*-IGS DGGE, (4) *fla*-IGS heteroduplex mobility assay, (5) *fla*-IGS sequence typing and (6) RAPD-PCR. In the case of each method dendograms were constructed from the results and Simpson's diversity indexes (1-D) were determined. The most discriminatory technique was the RAPD analysis (1-D=1.000) in which three primers were applied for the amplification. Using this method all isolates proved to be different strains. RAPD analysis was followed by *flaA*-RFLP in discriminatory ability (1-D=0.989), which allowed very good discrimination of the isolates as well. Direct sequencing of the intergenic region of flagellin genes (*fla*-IGS) was able to discriminate the *Campylobacter* isolates adequately (its Simpson's index of diversity was 0.924). Heteroduplex mobility assay and denaturing gradient gel electrophoresis of *fla*-IGS proved to be suitable techniques for characterisation of the strains, however diversity indexes of these methods were lower (0.872 and 0.859, respectively) compared with the indexes of the previous techniques. Based on the results of 16S rDNA-RFLP it can be concluded that this assay is not applicable for typing thermophilic *Campylobacter* isolates (its diversity index was only 0.141). Comparison of the results of the five different typing methods (rDNA-RFLP, *flaA*-RFLP, *fla*-IGS-DGGE, *fla*-IGS-HMA, and RAPD-PCR) by the application of principle component analysis resulted that strains belonging to the same species show higher similarity in their genomes than strains of the other species.

Although the *flaA-flaB* intergenic region showed significant polymorphism of *C. coli* and *C. jejuni* isolates the sequence similarities and differences did not prove to be characteristic at species level. If data of *fla*-IGS sequence analysis were compared with the results of *fla*-IGS DGGE and *fla*-IGS HMA it could be concluded that the last two methods are less efficient for typing purposes but their applicability for detection of polymorphism is adequate.

My results proved that molecular methods give more reliable results compared with conventional techniques and rout of transmission of pathogenic bacteria in the food chain can be detected efficiently with the application of molecular typing methods.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Aarts, H.J.M., van Lith L.A.J.T., Keijer, J. (1998) High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Letters in Applied Microbiology* **26**: 131-135.

Abu-Halaweh, M., Bates, J., Patel, B.K.C. (2005) Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR *Research in Microbiology* **156**: 107-114.

Acik, M.N. and Cetinkaya, B. (2006) Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Veterinary Microbiology* **115**: 370-375

Allen, V.M., Bull, S.A., Corry, J.E.L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Whyte, R., Gonzalez, A., Elviss, N., Humphrey, T.J. (2007) *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 54-61.

Alm, R., Guerry, P. and Trust, T.J. (1993b) Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* **175**: 3051-3057.

Alm, R.A., Guerry, P., Trust, T.J. (1993a) Significance of duplicated flagellin genes in *Campylobacter*. *Journal of Molecular Biology* **230**: 359-363.

Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5464-5473.

Anchorage Daily News (2008) Bacterial outbreak traced to Valley pea farm, state says (<http://www.adn.com/news/alaska/story/523329.html>) (letöltve: 2008. 03.18.)

Anonymus (2001) Non-O157 Shiga toxin-termelő *Escherichia coli* (STEC). (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-o157-stec.pdf>) (letöltve: 2009. május 14.)

Anonymus (2004) Advises the Food Standards Agency on the microbiological safety of food. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food: Second Report on *Campylobacter*. (<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf>) (letöltve: 2009. május 23.)

Anonymus (2008) Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with Pasteurized Milk from a Local Dairy - Massachusetts, 2007. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*, **57**: 1097-1100.

Arens, M. (1999) Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 612-626.

Atabay, H.I., Corry, J.E.L. and On, S.L.W. (1997) Isolation and characterization of a novel catalase-negative, urease-positive *Campylobacter* from cattle faeces. *Letters in Applied Microbiology* **24**: 59-64.

Axelsson-Olsson, D., Ellström, P., Waldenström, J., Haemig, P.D., Brudin, L., Olsen, B. (2007) *Acanthamoeba-Campylobacter* coculture as a novel method for enrichment of *Campylobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6864–6869.

Ayling, R.D., Woodward, M.J. Evans, S. and Newell, D.G. (1996) Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Research in Veterinary Science* **60**: 168–172.

Baird-Parker, T.C. (2000) The production of microbiologically safe and stable foods. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I, Chapter 1, 3-18. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Basselet, P., Wegrzyn, G., Enfors, S.-O., Gabig-Ciminska, M. (2008) Sample processing for DNA chip array-based analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Microbial Cell Factories* **7**: 29-39.

Best, E.L., Powell, E.J., Swift, C., Grant, K.A., Frost, J.A. (2003) Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters* **229**: 237-241.

Bhavsa, S.P., Kapadnis, B.P. (2007) Virulence factors of *Campylobacter*. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume 3, Number 2. ISSN: 1937-8289.

Bielaszewska, M., Schmidt, H., Liesegang, A., Prager, R., Rabsch, W., Tschäpe, H., Cízek, A., Janda, J., Bláhová, K., Karch, H. (2000) Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains and a source of human diseases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3470–3473.

Bielaszewska, M., Karch, H. (2000) Non-O157:H7 Shiga toxin (vercytotoxin)-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **16**: 711-718.

Biró, G. (2000) Élelmiszer-biztonság In: Biró, G. és Biró, Gy. *Élelmiszer-biztonság, Táplálkozás-egészségügy*. Agroinform Kiadó, Budapest.

Black, A.P., Kirk, M.D., Millard, G. (2006) *Campylobacter* outbreak due to chicken consumption at an Australian Capital Territory restaurant. *Communicable Diseases Intelligence* **30**: 373–377.

Blackburn, C.W. (2003) Microbiological analysis and food safety management: GMP and HACCP systems. In: McMeekin, T.A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. Chapter 1, 3-19. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Bolton, F.J., Gibson, D.M. (1994) Automated electrical techniques in microbiological analysis. In: Patel, P.D. (ed.) *Rapid analysis techniques in food microbiology*, 131-169. Blackie Academic & Professional, London.

Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J., Humphrey, T.J. (2006) Sources of *Campylobacter* spp. colonising housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 645-652.

Call, D.R., Brockman, F.J., Chandler, D.P. (2001) Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *International Journal of Food Microbiology* **67**: 71-80.

Capece, A., Fiore, C., Maraz, A., Romano, P. (2005) Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 136-144.

Cappelletti, J.M., Magras, C., Jouve, J.L., Federighi, M. (1999) Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology* **16**: 375-383.

Cardarelli-Leite, P., Blom, K., Patton, C.M., Nicholson, M.A., Steigerwalt, A.G., Hunter, S.B., Brenner, D.J., Barrett, T.J., Swaminathan, B. (1996) Rapid identification of *Campylobacter* species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 62-67.

Carle, G.F., Olson, M.V. (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 3756-3760.

Carroll, K.C., Adamson, K., Korgenski, K., Croft, A., Hankemeier, R., Daly, J., Park, C.H. (2003) Comparison of a commercial reversed passive latex agglutination assay to an enzyme immunoassay for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22**: 689-692.

Chaveerach, P., ter Huurne, A.A.H.M., Lipman, L.J.A., van Knapen, F. (2003) Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 711-714.

Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., Levy, D.D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3258-3263.

Chen, H.-C. and Stern, N.J. (2001) Competitive exclusion of heterologous *Campylobacter* spp. in chicks. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 848-851.

Cloak, O.M., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2001) A survey on the incidence of *Campylobacter* spp. and the development of a surface adhesion polymerase chain reaction (SA-PCR) assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in retail meat products. *Food Microbiology* **18**: 287-298.

Cloak, O.M., Fratamico, P.M. (2002). A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Protection* **65**: 266-273.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 81-87.

Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2002) An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* **12**: 407-411.

Constable, A., Jonas, D., Cockburn, A., Davi, A., Edwards, G., Hepburn, P., Herouet-Guicheney, C., Knowles, M., Moseley, B., Oberdörfer, R., Samuels, F. (2007) History of safe use as applied to

the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 2513–2525.

Corry, J.E.L. (2007) Spoilage organisms of red meat and poultry. In: Mead, G.C. (ed.) *Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs*. Chapter 5, 101-122. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Corry, J.E.L., Atabay, H.I., Forsythe, S.J., Mansfield, L.P. (2003) Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters. In: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. and Baird, R.M. (Eds.) *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, Second edition, Elsevier Science, Amsterdam, 271-315.

da Silva Meyer, A., Garcia, A.A.F., Pereira de Souza, A., Lopes de Souza Jr, C. (2004) Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L) *Genetics and Molecular Biology* 27: 83-91.

Davey, H.M., Kell, D.B. (1996) Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews* 60: 641–696.

de Boer, E. (2007) Detection and enumeration of pathogens in meat, poultry and egg products. In: Mead, G.C. (ed.) *Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs*. Chapter 10, 202-245. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

de Boer, E., Beumer, R.R. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **50**: 119-130.

De Mendonca, M.C.L., Ferreira, A.M.A., dos Santos, M.G.M., de Barros, J.J.F., von Hubinger, M.G., Couceiro, J.N.S.S. (2008) Heteroduplex mobility assay and single-stranded conformation polymorphism analysis as methodologies for detecting variants of human erythroviruses. *Journal of Virological Methods* **148**: 40-47.

De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P. (2006) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology* **23**: 809–813.

Deák, T. (2001) Identification of yeasts isolated from poultry meat. *Acta Biologica Hungarica*, **52**: 195-200.

Deák, T. (szerk.) (2006a) *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda kiadó, Budapest.

Deák, T. (2006b) *MikroBioDiverzitás. A mikrobavilág sokfélesége és változatossága*. Aula Kiadó, Budapest.

Delignette-Muller, M.L., Cornu, M. and the AFSSA STEC study group (2008) Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households. *International Journal of Food Microbiology*, **128**: 158-164.

Delwart, E.L., Shpaer, G., Mullins, J.I. (1995) Heteroduplex mobility assays for phylogenetic analysis. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. (eds.) *PCR Strategies*. 1st. ed. San Diego. Academic Press; 154-160.

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. (1999) Development of a mPCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* **29**: 406–410.

Denny, J., Bhat, M., Eckmann, K. (2008) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease*, **5**: 321-328.

Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., and Maiden, M.C.J. (2005) Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 340-347.

Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F. E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R. and Maiden, M.C. J. (2001) Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 14-23.

Djordjevic, S.P., Unicomb, L.E., Adamson, P.J., Mickan, L., Rios, R. and the Australian *Campylobacter* Subtyping Study Group (2007) Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by Multilocus Sequence Typing are reliably predicted by Restriction Fragment Length Polymorphism analyses of the *flaA* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 102-108.

Doig, P., Yao, R.J., Burr, D.H., Guerry, P., Trust, T.J. (1996) An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Molecular Microbiology* **20**: 885-894.

Dollhopf, S.L., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microbial Ecology* **42**: 495-505.

Doyle, E. (2003) Foodborne Parasites. A Review of the Scientific Literature. FRI Briefings (Food Research Institute, UW-Medison) 1-29. (<http://fri.wisc.edu/briefs/parasites.pdf>) (letöltve: 2009. május 14.)

Doyle, M.P., Roman, D.J. (1982) Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 1343-1353.

Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Chapter 10, 171-191. ASM Press, Washington D.C.

Dykes, G.A., Sampathkumar, B., Korber, D.R. (2003) Planctonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology* **89**: 1-10.

EFSA (2009) The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223.

Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.-H., Lindbäck, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Märklbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* **151**: 183-197.

Elvers, K.T., Park, S.F. (2002) Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a *luxS* encoded signalling molecule. *Microbiology* **148**: 1475–1481.

- Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* **56**: 297-314.
- Ertas, H.B., Cetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H. (2004) Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 203– 209.
- Evans, M.R., Roberts, R.J., Ribeiro, C.D., Gardner, D., Kembrey, D. (1996) A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit. *Epidemiology and infection* **117**: 457-462.
- Evguenieva-Hackenberg, E. (2005) Bacterial ribosomal RNA in pieces. *Molecular Microbiology* **57**: 318–325.
- Eyers, M., Chapelle, S., van Camp, G., Goossens, H., de Wachter, R. (1993) Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *Journal of Clinical Microbiology* **31**: 3340-3343.
- Field, L.H., Headley, V.L., Payne, S.M., Berry, L.J. (1986) Influence of iron on growth, morphology, outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **54**: 126-132.
- Fisher, S.G., Lerman, L.S. (1983) DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **80**: 1579-1583.
- Fitzgerald, C., Swaminathan, B. (2003) Genetic techniques: molecular subtyping methods. In: McMeekin, T.A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. Chapter 13, 271-293. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Lawson, P.A., Thorne, P., Byrer, D.E., Ross, H.M., Xerry, J., Thompson, P.M., Collins, M.D. (2004) *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2369-2373.
- Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W. (1998) Multiplex PCR for Enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 1795-1797.
- Fratamico, P.M., Sackitey, S.K., Wiedmann, M., Deng, M.Y. (1995) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2188-2191.
- Frost, J.A. (2001) Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 85S-95S.
- Fu, Z., Rogelj, S., Kieft, T.L. (2005) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* **99**: 47-57.
- Fuller-Pace F.V., Bullas, L.R., Delius, H. and Murray N.E. (1984) Genetic recombination can generate altered restriction specificity. *of the National Academy of Science of the United States of America* **81**: 6095-6099.

Fung, D.Y.C. (1991) Rapid methods and automation in microbiology. In: Fung, D.Y.C., Matthews, R.F. Instrumental methods for quality assurance in foods. CRC Press, USA.

Fung, D.Y.C. (2002) Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **1**: 3-25.

Gallien, P. (2002) Detection and subtyping of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC). In: Sachse, K., Frey, J. (eds.) PCR detection of Microbial Pathogens (Methods in molecular biology). Chapter 11: 163-184. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H., Euzéby, J., Tindall, B.J. (2007) Phylum „Proteobacteria”: the Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea, Release 7.7*. 244-270.

Gaynor, E.C., Ghorri, N., Falkow, S. (2001) Bile-induced 'pili' in *Campylobacter jejuni* are bacteria-independent artifacts of the culture medium. *Molecular Microbiology* **39**: 1546-1549.

Gharst, G., Hanson, D., Kathariou, S. (2006) Effect of direct culture versus selective enrichment on the isolation of thermophilic *Campylobacter* from feces of mature cattle at harvest. *Journal of Food Protection* **69**: 1024–1027.

Gibson, D. (2003) Electrical methods. In: McMeekin, T.A. (ed.) Detecting pathogens in food. Chapter 7, 147-164. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Gomes, L.H., Duarte, K.M.R., Argueso, J.L., Echeverrigaray, S., Tavares, F.C.A. (2000) Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiology* **17**: 217-223.

Gonzalez, I., Grant, K.A., Richardson, P.T., Park, S.F. and Collins, M.D. (1997) Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 759–763.

Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schober, C., Dieber, F., Köfer, J., Zechner, R., Zechner, E.L. (2003) Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2537-2546.

Gracias, K.S., McKillip, J.L. (2004) A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 883-890.

Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D., Rowe, M.T. (1996) Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Applied and Environmental microbiology* **62**: 631-636.

Grant, J., Wendelboe, A.M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., Rolfs, R.T. (2008) Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 outbreak, Utah and New Mexico, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1633-1636.

Green, S.J. (2005) A guide to denaturing gradient gel electrophoresis. Online hivatkozás: <http://ddgehelp.blogspot.com/2005/11/dgge-guide.html>. (letöltve 2008. április 25.)

- Griffith, M.W. (2000) Milk and Unfermented Milk Products. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I. Chapter 22: 507-534. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Griffiths, M. (2005) Quorum-sensing and virulence in foodborne pathogens. In: Griffiths, M. (ed) *Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance*. Chapter 6, 549-586. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Griffiths, M., Brovko, L. (2003) ATP bioluminescence. In: McMeekin, T.A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. Chapter 8, 165-185. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Guerry, P. (1997) Nonlipopolysaccharide surface antigens of *Campylobacter* species. *The Journal of Infectious Diseases* **176** (Suppl 2) :S122–S124.
- Guerry, P., Alm, R.A., Power, M.E., Logan, S.M. and Trust, T.J. (1991) Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *Journal of Bacteriology* **173**: 4757-4764.
- Guerry, P., Logan, S.M., Thornton, S. and Trust, T. (1990) Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *Journal of Bacteriology* **172**:1853-1860.
- Gunasekera, T.S., Veal, D.A., Attfield, P.V. (2003) Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology* **85**: 269–279.
- Gundogdu, O., Bentley, S.D., Holden, M.T., Parkhill, J., Dorrell, N., Wren, B.W. (2007) Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence. *BMC Genomics* **8**: 162-169.
- Haiden, R.T. (2004) In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y-W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J. (eds.) *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Chapter 5, 43-70. ASM Press, Washington, DC.
- Hajra, T.K.; Bag, P.K., Das, S.C., Mukherjee, S., Khan, A., Ramamurthy, T. (2007) Development of a simple latex agglutination assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. *Clinical and Vaccine Immunology* **14**: 600-604.
- Hanage, W.P., Feil, E.J., Brueggemann, A.B., Spratt, B. (2004) Multilocus sequence typing: strain characterisation, population biology, and patterns of evolutionary descent. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Unger, E.R., Relman, D.A. and White, T.J. (Eds) *Molecular microbiology*. Chapter 18, 235-243. ASM Press, Washington DC.
- Hani, E.K., Chan, V.L. (1995) Expression and Characterization of *Campylobacter jejuni* Benzoylglycine Amidohydrolase (Hippuricase) Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**: 2396-2402.
- Hein, I., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., Wagner, M. (2003) Application of single-strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis for fla sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 305–313.

- Hiett, K.L., Cox, N.A., Buhr, R.J., Stern, N.J. (2002) Genotype analyses of *Campylobacter* isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Current Microbiology* **45**: 400-404.
- Hilton, A.C., Mortibory, D., Banks, J.G., Penn, C.W. (1997) RAPD analysis of environmental, food and clinical isolates of *Campylobacter* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **18**: 119–124.
- Hoffman, S., Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hofnung, M., Hatfield, D., Schwartz, M. (1974) *malB* Region in *Escherichia coli* K-12: Characterization of New Mutations. *Journal of Bacteriology* **117**: 40-47.
- Holbrook, R. (2000) Detection of microorganisms in foods – Principles of culture methods. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) The microbiological safety and quality of food. Chapter 62, 1761-1790. Aspen Publishers, USA.
- Holland, J.L., Louie, L., Simor, A.E., Louie, M. (2000) PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Directly from Stools: Evaluation of Commercial Extraction Methods for Purifying Fecal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4108-4113.
- Hong, E., Doumith, M., Duperrier, S., Giovannacci, I., Morvan, A., Glaser, P., Buchrieser, C., Jacquet, C., Martin, P. (2007) Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. *International Journal of Food Microbiology* **114**: 187–194.
- Hornitzky, M.A., Vanselow, B.A., Walker, K., Bettelheim, K.A., Corney, B., Gill, P., Bailey, G., Djordjevic, S.P. (2002) Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 6439-6445.
- Houghton, S.G., Cockerill, F.R. (2006) Real-time PCR: overview and applications. *Surgery* **139**: 1-5.
- Huey, B., Hall, J. (1989) Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology* **171**: 2528-2532.
- Humphry, T., Jørgensen, F. (2006) Pathogens on meat and infection in animals – Establishing a relationship using campylobacter and salmonella as examples. *Meat Science* **74**: 89-97.
- Hunter, P.R. and Gaston, M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**: 2465-2466.
- Hwang, M.N., Ederer, G.M., 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* **1**: 114–115.
- Ingavale, S.S., Kaur, R., Aggaewal, P., Bachhawat, A.K. (1998) A minisatellite sequence within the propeptide region of the vacuolar carboxypeptidase Y gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology* **180**: 3727-3729.

Innis, M.A., Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Chapter 1. pp. 3-12. Academic Press, Inc., San Diego, California.

Iriarte, P., Owen, R.J. (1996) PCR-RFLP analysis of the large subunit (23S) ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology* **23**: 163-166.

Ishii, K., Fukui, M., Takii, S. (2000) Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology* **89**: 768-777.

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E. and Stricker, S. (2000) Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* **12**: 317-325.

Jackson, T.C., Acuff, G.R., Dickson, J.S. (1997) Meat, Poultry, and Seafood. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Chapter 5, 83-100. ASM Press, Washington D.C.

Jay, M.J., Loessner, M.J., Golden, D.A. (eds.) (2005) Modern food microbiology. *Chapter 4*: Fresh Meats and Poultry, 63-100; *Chapter 6*: Vegetable and Fruit Products, 125-148; *Chapter 7*: Milk, Fermentation, and Fermented and Nonfermented Dairy Products, 149-174. *Chapter 28*: Foodborne gastroenteritis caused by *Vibrio*, *Yersinia*, and *Campylobacter* species, 657-678. Springer Science and Business Media, Inc., USA.

Jensen, M. A. and Hubren R.J. (1996) Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2741-2746.

Jeon, B., Itoh, K., Misawa, N., Ryu, S. (2003) Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology* **47**: 833-839.

Jiménez, M., Soler, P., Venanzi, J.D., Canté, P., Varela, C., Martínez Navarro, F. (2005) An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in a school of Madrid, Spain. *Euro Surveillance* **10**: 118-121.

Jinneman, K.C., Yoshitomi, K.J., Weagant, S.D. (2003) Multiplex real-time PCR method to identify Shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H⁻ serotype. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6327-6333.

Johnson, J.K., Arduino, S.M., Stine, O.C., Johnson, J.A., Harris, A.D. (2007) Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 3707-3712.

Johnson, W.M. and Lior, H. (1987) Response of chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *E. coli* and possible misinterpretation as heat-labile (HL) enterotoxin. *FEMS Microbiological Letters* **43**: 19-23.

Jones, K. (2001) Campylobacters in water, sewage and the environment. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 68S-79S.

Joshua, G.W.P, Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V., Wren, B. W. (2006) Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **152**: 387-396.

Kärenlampi, R.I., Tolvanen, T.P., Hänninen, M.-L. (2004) Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5731-5738.

Kaper, J.B. (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* **295**: 355-356.

Karch, H., Janetzki-Mittmann, C., Aleksic, S., and Datz, M. (1996) Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:516–519.

Kärenlampi, R.I., Tolvanen, T.P., Hänninen, M.-L. (2004). Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5731–5738.

Keener, K.M., Bashor, M.P., Curtis, P.A., Sheldon, B.W., Kathariou, S. (2004) Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**: 105-116.

Keramasa, G., Bangb, D.D., Lundb, M., Madsenb, M., Rasmussenc, S.E., Bunkenborgd, H., Tellemana, P., Christensena, C.B.V. (2003) Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes* **17**: 187–196.

Kim, H-Y.,I Kwak, I-S., Hwang, I-G., Gwang, P.K. (2008) Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *Journal of Virological Methods*, **153**: 104-110.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1328–1333.

Knura, S., Gymnich, S., Rembialkowska, E., Petersen, B. (2006) Agri-food production chain. In: Luning, P.A., Devlieghere, F., Verhé, R. (eds.) Safety in the agri-food chain. Chapter 1, 19-66. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

Kolbert, C.P., Rys, P.N., Hopkins, M., Lynch, D.T., Germer, J.J., O’Sullivan, C.E., Trampuz, A., Patel, R. (2004) 16S ribosomal DNA sequence analysis for identification of bacteria in a clinical microbiology laboratory. In : Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Unger, E.R., Relman, D.A. and White, T.J. (Eds) Molecular microbiology. ASM Press, Washington DC. Chapter 29, 361-377.

Konkel, M.E., Kim, B.J., Klena, J.D., Young, C.R., Ziprin, R. (1998) Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **66**: 3666–3672.

Koopmans, M., Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* **90**: 23-41.

Korczak, B.M., Stieber, R., Elmer, S., Burnens, A.P., Frey, J., Kuhnert, P. (2006) Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**: 937-945.

Kotula, K.L., Kotula, A.W. (2000) Fresh red meats. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) The microbiological safety and quality of food. Chapter 17, 361-388. Aspen Publishers, USA.

Koutsoumanis, K.P., Stamatiou, A.P., Drosinos, E.H., Nychas G.-J.E. (2008) Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology* **25**: 915– 921.

Kudirkiene, E., Malakauskas, A., Serniene, L., Malakauska, M. (2008) Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by PCR-RFLP in broiler flocks. *Veterinarija ir Zootechnika* **42**: 44-47.

Lawson, A.J., Linton, D., Stanley, J. and Owen, R.J. (1997) Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 375-380.

Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J., Stanley, J., (1997) PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2568-2572.

Liu, G., Han, Y., Li, X., Song, S. (2006) Applicability of a rapid method based on immunomagnetic capture-fluorescent PCR assay for *Campylobacter jejuni*. *Food Control* **17**: 527-532.

Madden, R.H., Moran, L., Scates, P. (1996) Sub-typing of animal and human *Campylobacter* spp. using RAPD. *Letters in Applied Microbiology* **23**: 167-170.

Madden, R.H., Moran, L., Scates, P. (1998) Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 703–708.

Maiwald, M. (2004) Broad-range PCR for detection and identification of bacteria. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Unger, E.R., Relman, D.A. and White, T.J. (Eds) Molecular microbiology. ASM Press, Washington DC. Chapter 30, 379-390.

Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C-G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S., Shinagawa, H. (1998) Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Derived from Sakai Outbreak. *DNA Research* **5**: 1-9.

Manafi, M. (1996) Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology* **31**: 45-58.

Manfreda, G., De Cesare, A., Bondioli, V., Franchini, A. (2003) Comparison of the BAXR System with a multiplex PCR method for simultaneous detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* **87**: 271–278.

Manzano, M., Cocolin, L., Longo, B., Comi, G., (2004) PCR-DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**: 23-27.

Maráz, A., Marin, F., Cava, R. (2006) Microbial analysis of food. In: Luning, P.A., Devlieghere, F., Verhé, R. (eds.) Safety in the agri-food chain. Chapter 11, 471-524. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

March, J.C., Bentley, W.E. (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 495–502.

Marques, A.S.A., Marchaisson, A., Gardan, L., Samson, R. (2008) BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology* **31**: 106-115.

Marshall, S.M., Melito, P.L., Woodward, D.L., Johnson, W.M., Rodgers, F.G., Mulvey, M.R. (1999) Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 4158-4160.

Mazurier, S., van de Giessen, A., Heuvelman, K., Wernars, K. (1992) RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Letters in Applied Microbiology* **14**: 260-262.

Mead, G.C. (2000) Fresh and further-processed poultry. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) The microbiological safety and quality of food. Chapter 20, 445-471. Aspen Publishers, USA.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffith, P.M., Taxue, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **5**: 607-625.

Meng, J., Zhao, S., Doyle, M.P. (1998) Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology* **45**: 229-235.

Merrill, L., Richardson, J., Kuske, C.R. and Dunbar, J. (2003) Fluorescent heteroduplex assay for monitoring *Bacillus anthracis* and close relatives in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3317–3326.

Miller, G.M., Parker, C.T., Heath, S. and Lastovica, A.J. (2007) Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the *nap* locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiology* **7**: 11-18.

Miller, W.G. and Mandrell, R.E. (2006) *Campylobacter* in the food and water supply: prevalence, outbreaks, isolation and detection. In: Ketley, J. and Konkel, M.E. (Eds.) *Campylobacter jejuni*: New Perspectives in Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp. 101-163.

Miranda, R.L., Conway T., Leatham, M.P., Chang, D.E., Norris, W.E., Allen, J.H., Stevenson, S.J., Laux, D.C., Cohen, P.S. (2004) Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infection and Immunity* **72**: 1666-1676.

Misawa, N., Shinohara, S., Satoh, H., Itoh, H., Shinohara, K., Shimomura, K., Kondo, F., Itoh, K. (2000). Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-based random amplified polymorphism DNA analysis. *Veterinary Microbiology* **71**: 59–68.

Mogensen, G. and Holm, F. (2003) Food pathogens: A challenge for European policy on food safety, nutritive value and eating quality. Faire-Flow 4 synthesis report. INRA, France.

Mohamed, A.M., Bastola, D.R., Morlock, G.P., Cooksey, R.C., Hinrichs, S.H. (2004) Temperature-mediated heteroduplex analysis for detection of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance and differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by denaturing high- performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 1016-1023.

Moreno, C., Romero, J., Espejo, R.T. (2002) Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* **148**: 1233–1239.

Moreno, Y., Ferrús, M.A., Vanoostende, A., Hernández, M., Montes, R.M., Hernández, J. (2002) Comparison of 23S polymerase chain-restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiology Letters* **211**: 97-103.

Morooka, T., Umeda, A., Amako, K. (1985) Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology* **131**: 1973–80.

Møller Nielsen, E., Ladefoged Nielsen, N. (1999) Serotypes and typability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry products. *International Journal of Food Microbiology* **46**: 199-205.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273.

Nachamkin, I. (1997) *Campylobacter jejuni*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds.) Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, Chapter 9, 159-170.

Nachamkin, I., Allos, B.M., Ho, T. (1998) *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 555-567.

Nachamkin, I., Ung, H. and Patton, C.M., (1996) Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**: 277-281.

Najdenski, H., Heyndrickx, M., Herman, L., Messens, W. (2008) *Fla*-DGGE analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cecal samples of broilers without cultivation. *Veterinary Microbiology* **127**: 196-202.

Naravaneni, R. and Jamil, K. (2005) Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology* **54**: 51–54.

Nascimento, E., Martinez, R., Rodrigues Lopes, A., de Souza Bernardes, L.A., Pomponio Barco, C., Goldman, M.H.S., Taylor, J.W., McEwen, J.G., Pasetto Nobrega, M., Nobrega, F.G., Goldman,

- G.H. (2004) Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5007-5014.
- Newell, D.G., Shreeve J.E., Toszeghy, M., Domingue, G., Bull, S., Humphrey, T., Mead, G. (2001) Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2636-2640.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., On, S.L. (2000) Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3800–3810.
- Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Granly Koch, A., Arneborg, N. (2008) Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science*, **80**: 919–926.
- Nishura, M.; Nukina, M.; Jin Mei, Y.; Bao Quan, S; Jain Jun, M.; Ohta, M.; Saida, T.; Uchiyama, T. (1996) PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. *FEMS Microbiology Letters* **142**: 133-138.
- Nowrouzian, F., Wold, A.E., Adlerberth, I. (2001) Computer-Based Analysis of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Fingerprints for Typing of Intestinal *Escherichia coli*. *Molecular Biology Today* **2**: 5-10.
- Nuijten, P.J.M., van den Berg, A.J.G., Formentini, I., van der Zeijst, B.A.M. and Jacobs, A.A.C. (2000) DNA rearrangements in the flagellin locus of an *flaA* mutant of *Campylobacter jejuni* during colonization of chicken ceca. *Infection and Immunity* **68**: 7137–7140.
- Oda, Y., Ouchi, K. (1989) Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1495-1499.
- Okuda, J., Fukumoto, M, Takeda, Y. and Nishibuchi, M. (1997) Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infection and immunity* **65**: 428–433.
- Oliveira, T.C.R.M., Barbut, S., Griffiths, M.W. (2005) Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* **104**: 105–111.
- On, S.L.W. (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, **90**: 1S-15S.
- Oribi-Danso, K., Paul, N., Jones, K. (2001) The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 256-267.
- Osek, J. (2003) Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 1217-1225.

Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H.M., Whitehead, S., Barrell, B.G. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**: 665-668.

Paton, A.W., Paton, J.C. (1998) Detection and characterisation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111} and *rfb*_{O157}. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 598-602.

Payne, R.E., Lee, M.D., Dreesen, D.W., Barnhart, H.M. (1999) Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 260-263.

Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P. (2004) Detection by 50-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* **18**: 185-192.

Pickett, C.L., Auffenberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L., Jusuf, S.S. (1992) Iron acquisition and hemolysis production by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **60**: 3872-3877.

Poly, F., Threadgill, D. and Stintzi, A. (2004) Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. *Journal of Bacteriology*, **186**: 4781-4795.

Rademaker, J.L.W., Savelkoul, P. (2004) PCR Amplification-Based Microbial Typing. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.-W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J. (eds.) *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Chapter 16, 197-222. ASM Press, Washington, DC.

Raibaud, O., Roa, M., Braun-Breton, C., Schwartz, M. (1979) Structure of the *malB* Region in *Escherichia coli* K12. I. Genetic Map of the *malK-lamB* Operon. *Molecular and General Genetics* **174**: 241-248.

Raybourne, R., Tortorello, M. (2003) Microscopic techniques: DEFT and flow cytometry. In: McMeekin, T.A. (ed.) *Detecting pathogens in food*. Chapter 9, 186-216. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Reischl, U., Youssef, M.T., Kilwinski, J., Lehn, N., Zhang, W.L., Karch, H., Strockbine, N.A. (2002) Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2555-2565.

Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J., Grau, F.H. (eds). (1998) *Microorganisms in foods 6. Microbial ecology of food commodities*. Chapter 5.: Vegetables and vegetable products, 215-251. Blackie Academic & Professional, London.

Robinson, D.A. (1981) Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal* **282**: 1584.

- Robinson, J.P. (2004) Flow cytometry. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering 630-640. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Rodler, M. (2006) Az élelmiszer-mikrobiológia története. *Budapesti Népegészségügy* **2**: 131-136.
- Rossetti, L., Giraffa, G. (2005) Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* **63**: 135– 144.
- Rossi, M.L., Paiva, A., Tornese, M., Chianelli, S., Troncoso, A. (2008) *Listeria monocytogenes* outbreaks: A review of the routes that favor bacterial presence. *Revista Chilena de Infectología*, **25**: 328-335.
- Rönner, A.C., Engvall, E.O., Andersson, L. and Kaijser, B. (2004). Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* **96**: 173-179.
- Sanderson, K., Nichols, D. (2003) Genetic techniques: PCR, NASBA, hybridisation and microarrays. In: McMeekin, T.A. (ed.) Detecting pathogens in food. Chapter 12, 259-270. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Sauders, B.D, Schukken, Y., Kornstein, L., Reddy, V., Bannerman, T., Salehi, E., Dumas, N., Anderson, B.J., Massey, J.P., Wiedmann, M. (2006) Molecular epidemiology and cluster analysis of human listeriosis cases in three U.S. states. *Journal of Food Protection* **69**: 1680-1689.
- Scates, P., Moran, L. and Madden, R.H. (2003) Effect of incubation temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* genotypes from foodstuffs enriched in Preston broth. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4658-4661.
- Scheutz, F., Strockbine, N.A. (2005) Genus I. *Escherichia*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B: The Gammaproteobacteria, 607-624. Springer Inc., New York, USA.
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995) Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infection and Immunity* **63**: 1055-1061.
- Schmidt, H., Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 2364-2367.
- Schouls, L.M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J.A., Willems, R.J.L., Dingle, K.E., Colles, F.M. and Van Embden, J.D.A. (2003) Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 15-26.
- Sebald, M., Veron, M. (1963) Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions (Base DNA content and classification of vibrios). *Annales de l'Institut Pasteur* **105**: 897-910.
- Sharpe, N.A. (2000) Detection of microorganisms in food: Principles of physical methods for separation and associated chemical and enzymological methods of detection. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) The microbiological safety and quality of food. Chapter 17, 1734-1760. Aspen Publishers, USA.

Sheffield, V.C., Cox, D.R., Myers, R.M. (1990) Identifying DNA polymorphisms by denaturing gradient gel electrophoresis. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Chapter 26. pp. 206-218. Academic Press, Inc., San Diego, California.

Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.

Singer, R.S., Cox, L.A., Dickson, J.S., Hurd, H.S., Phillips, I., Miller, G.Y. (2007) Modeling the relationship between food animal health and human foodborne illness. *Preventive Veterinary Medicine* **79**: 186–203.

Snelling, W.J., McKenna, J.P., Lecky, D.M., Dooley, J.S.G. (2005) Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5560-5571.

Spano, G., Lonvaud-Funel, A., Claisse, O., Massa, S. (2007) In Vivo PCR-DGGE Analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Populations in Red Wine. *Current Microbiology* **54**: 9-13.

Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.

Stannard, C.J., Gibbs, P.A. (1986) Rapid microbiology: applications of bioluminescence in the food industry - a review. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1**: 3-10.

Stefan, A., Scaramagli, S., Bergami, R., Mazzini, C., Barbanera, M., Perelle, S., Fach, P. (2007) Real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay methods for detecting Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in mincemeat samples. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 337-342.

Steinhauserova, I., Ceskova, J., Fojtikova, K., Obrovská, I. (2001) Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 470-475.

Steinhauserova, I., Ceskova, J., Nebola, M. (2002) PCR/restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of human and poultry *Campylobacter jejuni* strains. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 354-358.

Stephan, R., Hoelzle, L.E. (2000) Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. *Letters of Applied Microbiology* **31**:139–142.

Storz, G., Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Current Opinions in Microbiology* **2**: 188-194.

Strachan, N.J.C., Dunn, G.M., Locking, M.E., Reid, T.M.S., Ogden, I.D. (2006) *Escherichia coli* O157: Burger bug or environmental pathogen? *International Journal of Food Microbiology*, **112**: 129-137.

Studer, E., Domke, M., Wegmüller, B., Luthy, J., Schmid, S., Candrian, U. (1998) RFLP and sequence analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* PCR products amplified directly from environmental samples. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **31**: 537-545.

- Szeitzné Szabó, M. (szerk.) (2008) Élelmiszer-biztonsági helyzetelemzés és kockázatértékelés. Agroinform Kiadó, Budapest.
- Szelényi, L. (2004) Főkomponens analízis. In: Szűcs, I. (ed.) Alkalmazott statisztika. VIII/1. fejezet, 405-446. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest.
- Teel, L.D., Daly, J.A., Jerris, R.C., Maul, D., Svanas, G., O'Brien, A.D., Park, C.H. (2007) Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by optical immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 3377-3380.
- Tholozan, J.L., Cappellet, J.M., Tissier, J.P., Delattre, G., Federighi, M. (1999) Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1110-1116.
- Thomas, L.M., Long, K.A., Good, R.T., Panaccio, M., Widders, P.R. (1997) Genotypic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates in a commercial broiler flock. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1874-1877.
- Thomas, C. Hill, D.J., Mabey, M. (1999) Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 1024-1032.
- Thornton, S.A., Logan, S.M., Trust, T.J., Guerry, P. (1990) Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infection and Immunity* **58**: 2686-2689.
- Thrall, L. (2008) A bit of food safety history. (Letöltve: 2008. 03. 04.) http://www.foodservice.com/editorials/ed_listing_detail.cfm?&article_id=692
- Todd, C.S., M.Toth, T., Busa-Fekete, R. (2008) Graph Clus, a MATLAB program for cluster analysis using graph theory. *Computers & Geosciences*, doi:10.1016/j.cageo.2008.05.007. (Article in Press)
- Tu, S.-I., Uknalis, J., Yamashoji, S., Gehring, A. and Irwine, P. (2005) Luminescent methods to detect viable and total *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **13**: 57-70.
- Tyler, K.D., Wang, G., Tyler, S.D., Johnson, W.M. (1997) Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 339-346.
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Saxelin, M. (1999) Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3908-3914.
- Upchurch, DA, Shankarappa, R, Mullins, J.I. (2000) Position and degree of mismatches and the mobility of DNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Research*, **28**: e69, i-vi.
- Uyttendale, M., Debevere, J. (2003) The use of applied systematics to identify foodborne pathogens. In: McMeekin, T.A. (ed.) Detecting pathogens in food. Chapter 15, 332-359. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

- van Ooyen, A. (2001) Theoretical aspects of pattern analysis. In: Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Struelens, M. (eds.) New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Chapter 2, 31-45. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands
- vanVliet, A.H.M., Ketley, J.M. (2001) Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 45S-56S.
- Volokhov, D., Chizhikov, V., Chumakov, K. and Rasooly, A. (2003) Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4071-4080.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **23**: 4407-4414.
- Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G. (1999) Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1636-1643.
- Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J. and Ruiz-Palacios, G.M. (1986) Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiological Reviews* **50**:81-94.
- Wang, R.-F., Cao, W.-W., Cerniglia, C.E. (1997) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 727-736.
- Wang, G. Clifford, G.C., Rodgers, F.G. (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3613-3619.
- Wang, Y.H., Griffith, J. (1991) Effects of bulge composition and flanking sequence on the kinking of DNA by bulged bases. *Biochemistry* **30**: 1358-1363.
- Wassenaar, T.M. (1997) Toxin production by *Campylobacter*. *Clinical Microbiological Review* **10**: 466-476.
- Wassenaar, T.M., Newell, D.G. (2000) Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1-9.
- Wassenaar, T.M., Blaser, M.J. (1999) Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection* **1**: 1023-1033.
- Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M.C., Newell, D.G., Nuijten, P.J.M. and van der Zeijst, B.A.M. (1994) Differential flagellin expression in a *flaA flaB*⁺ mutant of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **62**: 3901-3906.
- Wegmüller, B., Lüthy, J. and Candrian, U. (1993) Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2161-2165.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-7218..

Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., Carroll, C., O'Leary, A., Fanning, S., Collins, J.D., McNamara, E., Moore, J.E., Cormican, M. (2004) Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 111-118.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.

Willshaw, G.A., Cheasty, T., Smith, H.R. (2000) *Escherichia coli*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume II., Chapter 43, 1136-1177.

Workman, S.N., Mathison, G.E., Lavoie, M.C. (2005) Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 2642-2650.

Yang, L. and Bashir, R. (2008) Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **26**: 135-150.

Yoon, J.W., Hovde, C.J. (2008) All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of Veterinary Science*, **9**: 219-231.

Young, V.B., Knox, K.A. and Schauer, D.B. (2000) Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infection and immunity* **68**: 184-191.

Yu, L.S.L., Uknalis, J. and Tu, S.-I. (2001) Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *Journal of Immunological Methods* **256**: 11-18.

Zhao, T., Doyle, M.P. (2001) Evaluation of universal pre-enrichment broth for growth of heat-injured pathogens. *Journal of Food Protection* **64**: 1751-1755.

Zorman, T., Heyndrickx, M., Uzunović-Kamberović, S., Smole Možina, S. (2006) Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*, **110**: 24-33.

Törvények, rendeletek, szabványok

2003. évi LXXXII. törvény (VII. 29.) Az élelmiszerekről. Meghatározza az élelmiszer-vállalkozások működésének feltételeit, biztosítva ezzel a fogyasztók egészségének, érdekeinek, valamint a piaci verseny tisztaságának védelmét, a fogyasztók megfelelő tájékoztatását és az élelmiszereknek az Európai Unió tagállamai közötti szabad áramlását, illetve segítve az élelmiszerek nemzetközi kereskedelmét

2005. évi CLIX. törvény (XII. 25.) Egyes élelmiszer-biztonsággal kapcsolatos törvények módosításáról.

2008. évi XLVI. törvény (VII. 2.) Az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről. Az emberek biztonságos élelmiszerral történő ellátásához a teljes élelmiszerlánc egységes és folyamatos hatósági felügyeletének biztosítása.

178/2002/EK rendelet (2002. január 28.) Az *Európai Parlament és a Tanács rendelete az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról.*

2073/2005/EK rendelet (2005. november 15.) Az *élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól.*

4/1998 EüM rendelet (X1.11.) Az *élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről.*

46/2007 EüM rendelet (X.29.) Az *élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről* szóló 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet módosításáról.

EN ISO 10272-1:2006. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a *Campylobacter* spp. kimutatására és számlálására. 1. rész: Kimutatási módszer. (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection of Campylobacter spp. Part 1: Detection method*)

EN ISO 16654:2001. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az *Escherichia coli* O 157 kimutatására. (*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157*)

EN ISO 16140:2003. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A választható módszerek validálásának protokollja. (*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods*)

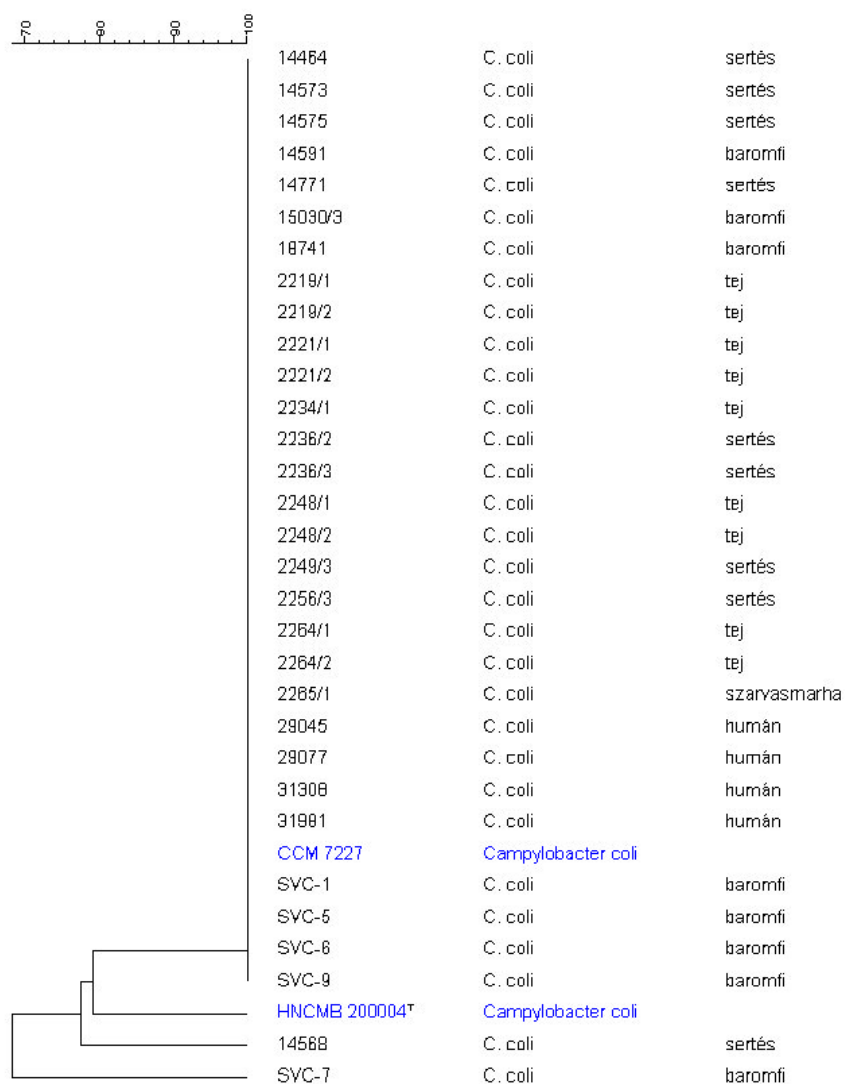
Internetes hivatkozások

<http://www.cdc.gov/index.htm>

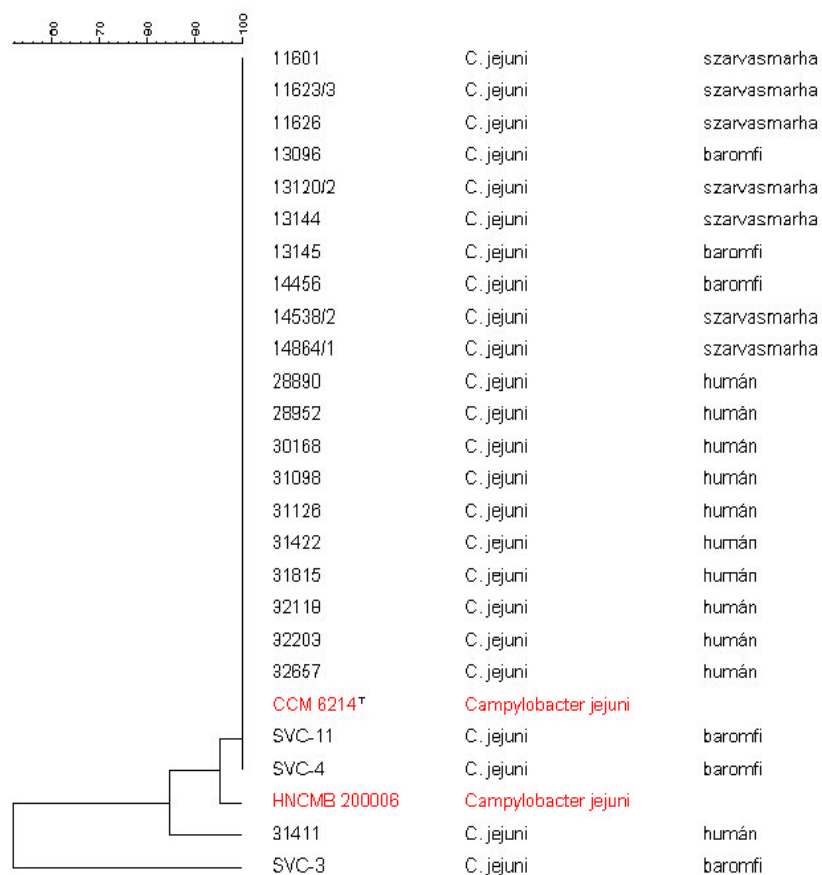
<http://www.mlst.net>

11. MELLÉKLET

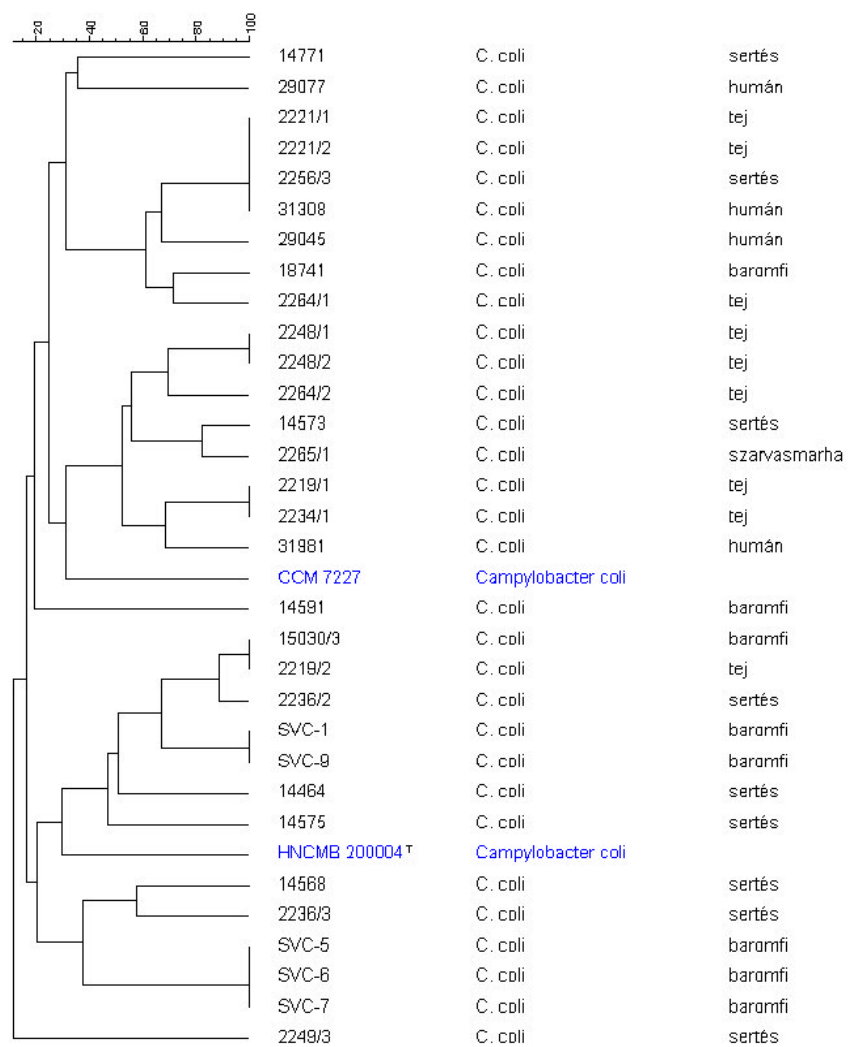
11.1. Az eltérő PCR-alapú módszerekkel kapott tipizálási eredmények *Campylobacter coli* és *C. jejuni* izolátumok esetében



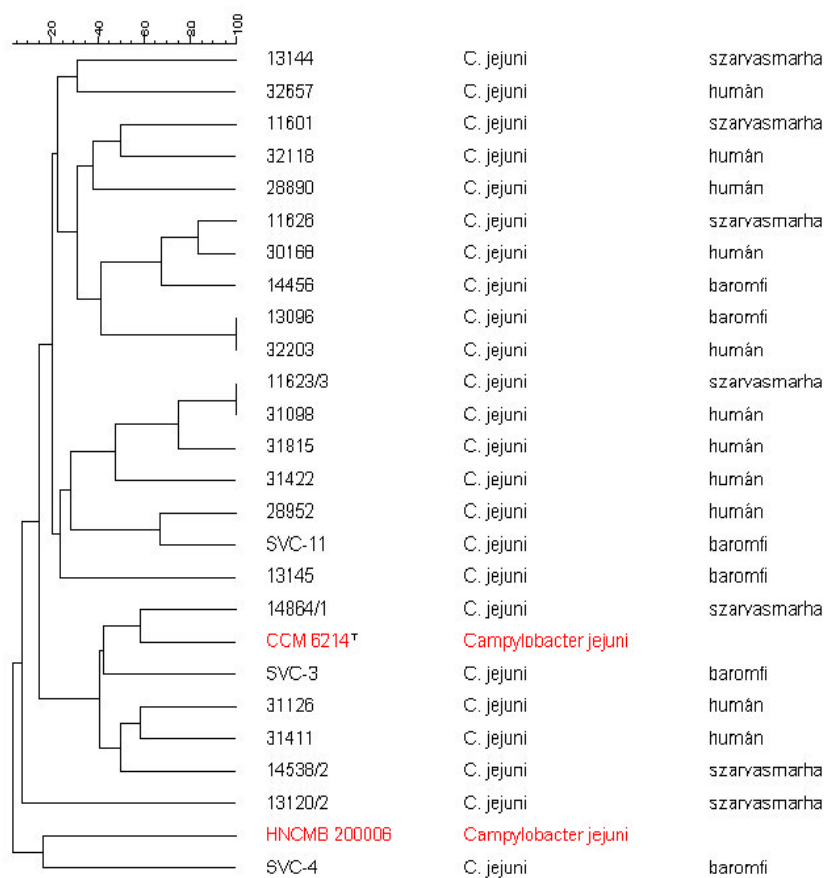
29. ábra: A vizsgált *C. coli* izolátumok rDNS-RFLP vizsgálatával kapott kombinált dendrogramja



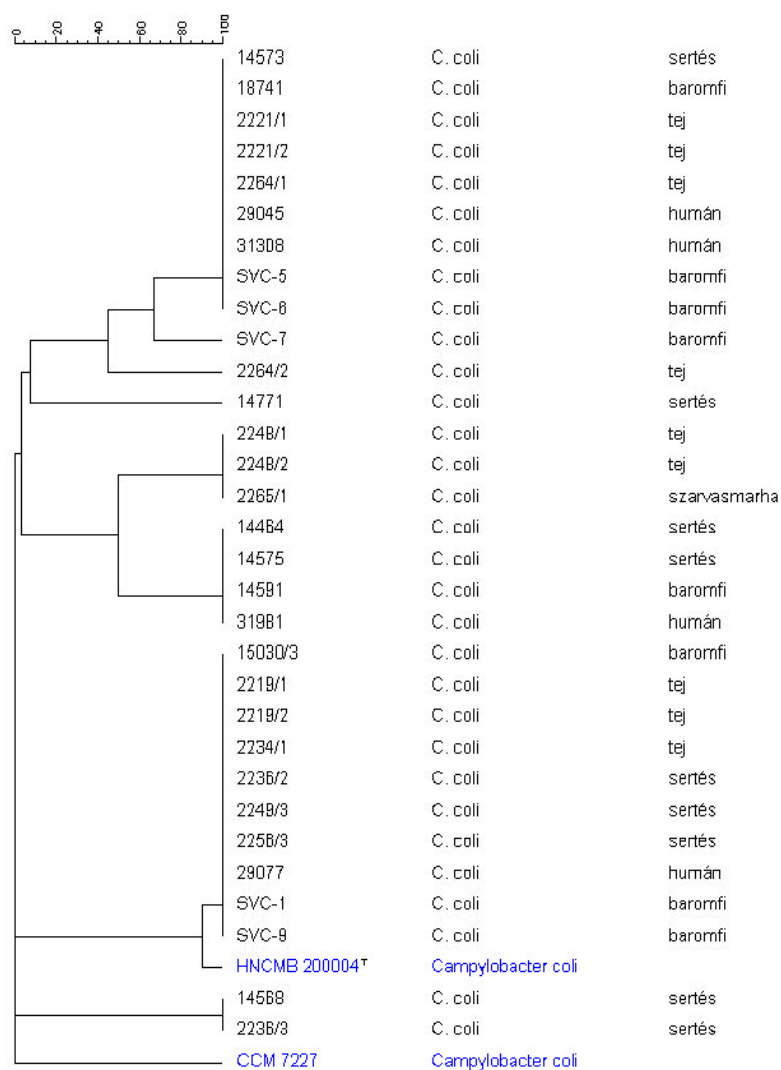
30. ábra: A vizsgált *C. jejuni* izolátumok rDNS-RFLP vizsgálatával kapott kombinált dendogramja



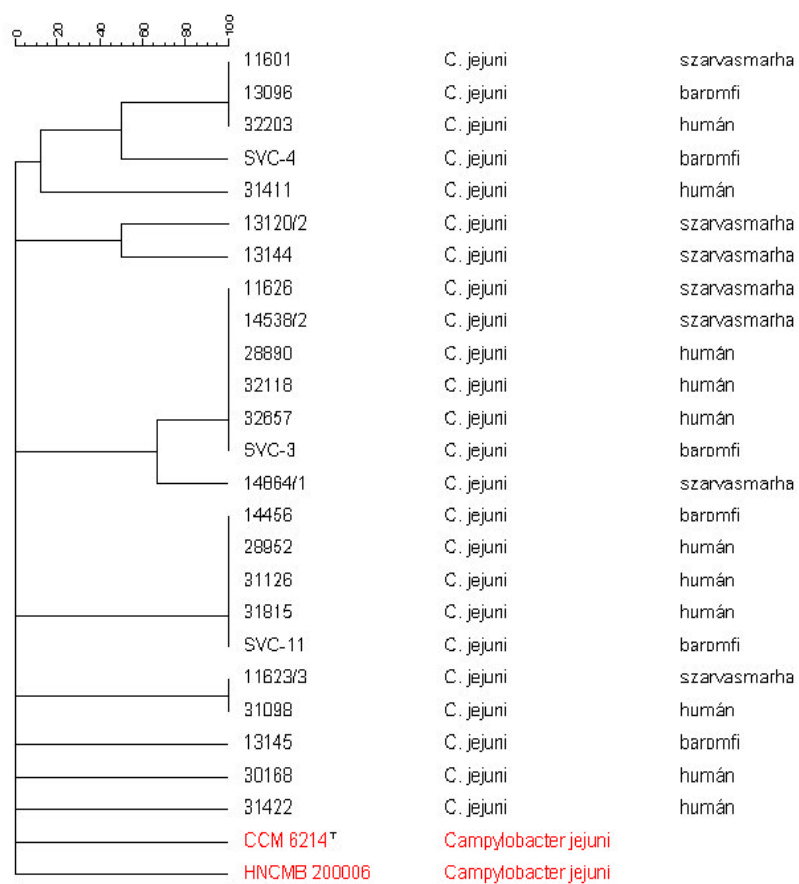
31. ábra: A vizsgált *C. coli* törzsek *flaA*-RFLP vizsgálattal kapott kombinált dendrogramja



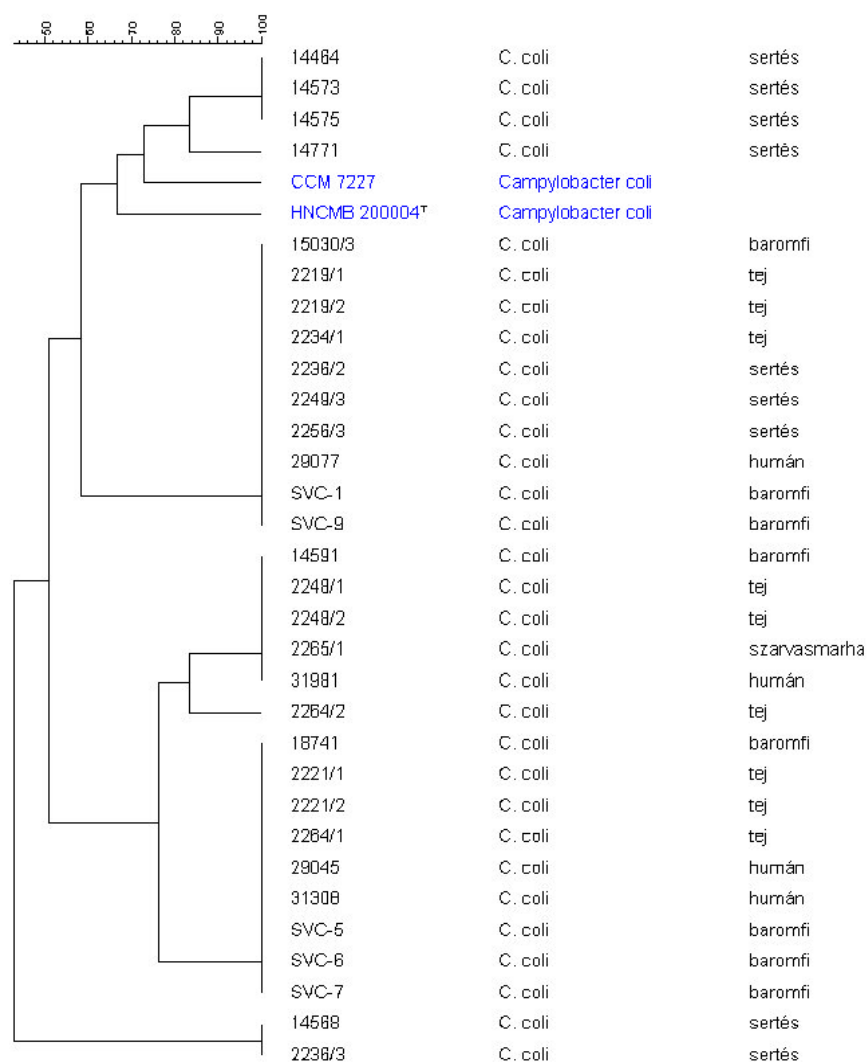
32. ábra: A vizsgált *C. jejuni* törzsek *flaA*-RFLP vizsgálatával kapott kombinált dendrogramja



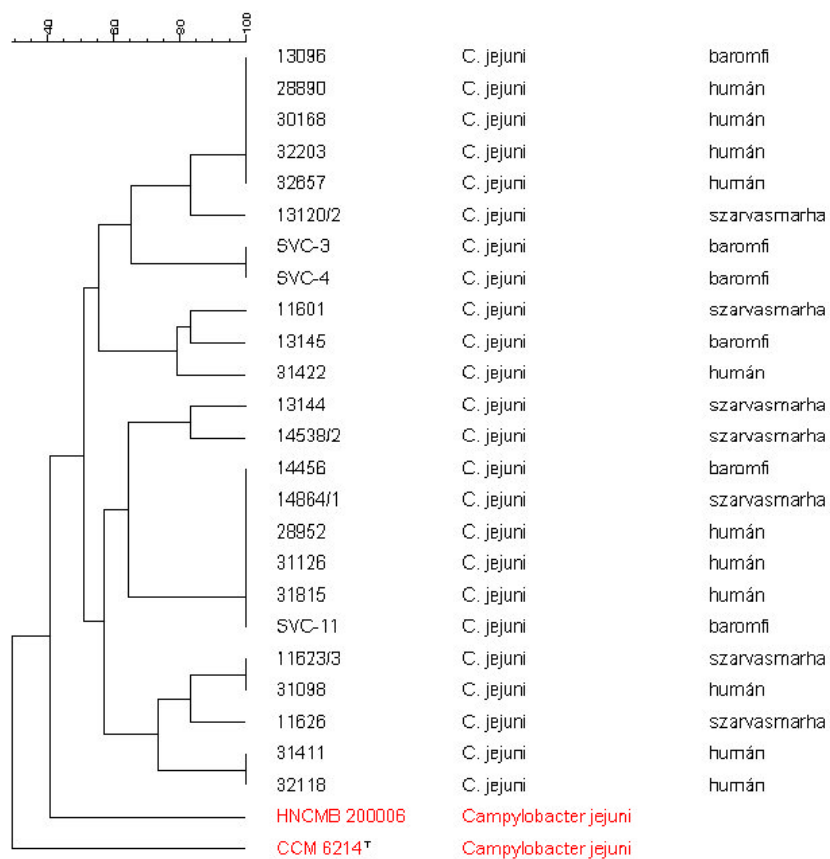
33. ábra: A vizsgált *C. coli* törzsek *flaA*-DGGE vizsgálatával kapott kombinált dendrogramja



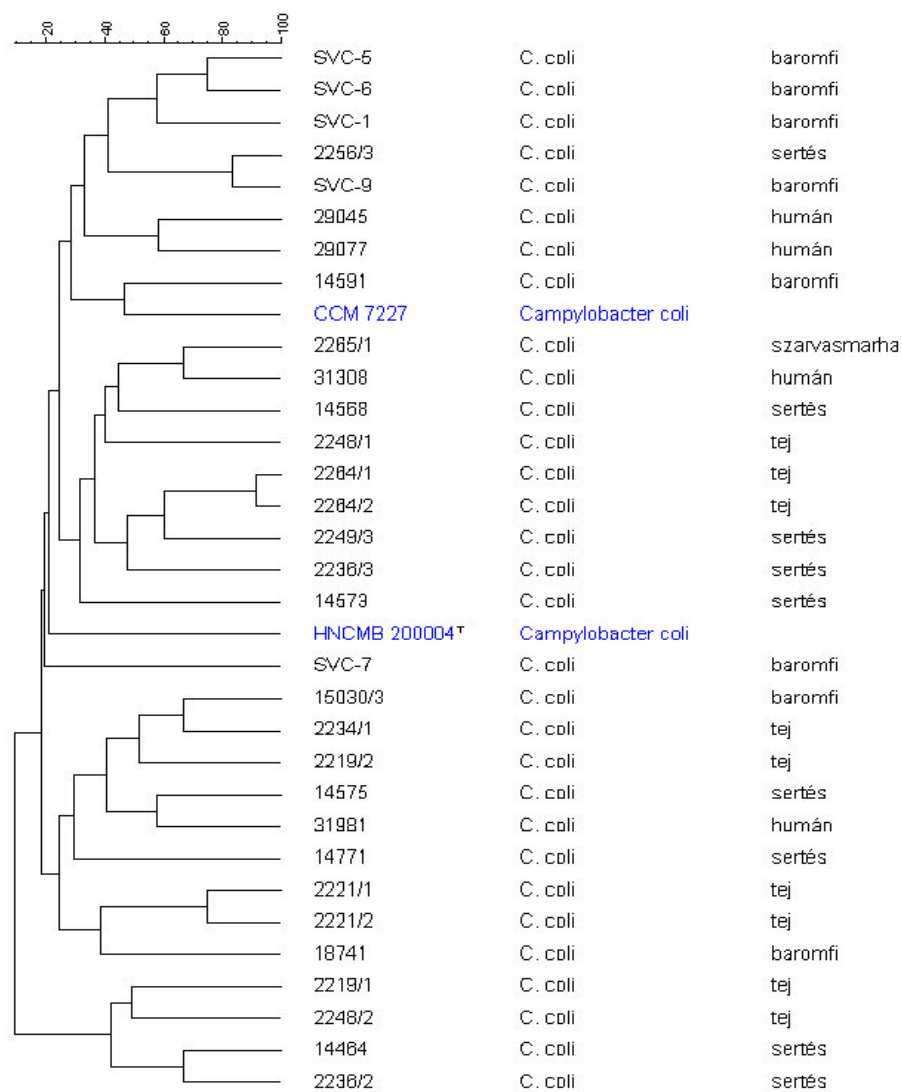
34. ábra: A vizsgált *C. jejuni* törzsek *flaA*-DGGE vizsgálatával kapott kombinált dendrogramja



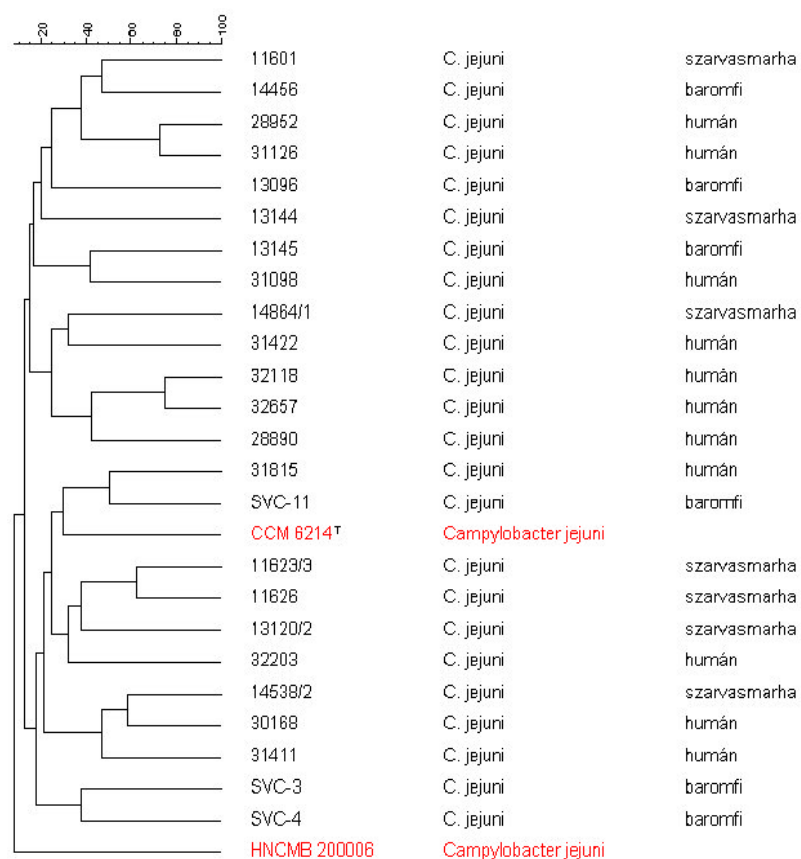
35. ábra: A vizsgált *C. coli* törzsek *fla*-IGS-heteroduplex mobilitási vizsgálatával kapott kombinált dendrogramja



36. ábra: A vizsgált *C. jejuni* törzsek *fla*-IGS-heteroduplex mobilitási vizsgálatával kapott kombinált dendogramja



37. ábra: A vizsgált *C. coli* törzsek RAPD-PCR analízisével kapott kombinált dendrogram



38. ábra: A vizsgált *C. jejuni* törzsek RAPD analízisével kapott kombinált dendrogram

11.2. A vizsgált *Campylobacter* izolátumok *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szekvenciájának nukleotid sorrendje

Campylobacter coli és *C. jejuni* (fekete kiemeléssel jelölve) izolátumok CF02 és CF03 primer pár által közrefogott DNS szakaszának szekvenciája (1-76-ig)

2219/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2236/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-9	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2219/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2234/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2256/3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
15030/3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
28890	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
29077	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
32657	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2249/3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
13096	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
32203	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
32018	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-6	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2221/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2221/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2264/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
18741	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
29045	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31308	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-5	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-7	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14573	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
32118	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31411	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-11	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14456	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
28952	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31126	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31815	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14464	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14864/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14575	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
11626	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14591	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31981	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
11601	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
13145	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31422	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
31098	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
11623/3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2248/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2265/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2248/1	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14771	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
2264/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
SVC-4	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCACAGGCTAATTCGTTTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-T
14568	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCTCAAGCAAAATTCAGTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-A
2236/3	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCTCAAGCAAAATTCAGTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-A
13120/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCTCAAGCAAAATTCAGTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-A
13144	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCTCAAGCAAAATTCAGTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-A
14538/2	GCTCAAAGTGGTTCCTTATGCGATGGCTCAAGCAAAATTCAGTCAGCAAAATGTTTTAAGATTACTACAGTAGTT-A

11.2. (folytatás)

(77-152-ig)

2219/2	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2236/2	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-9	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2219/1	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2234/1	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2256/3	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
15030/3	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
28890	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
29077	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
32657	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-1	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2249/3	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
13096	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
32203	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
30168	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-6	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2221/1	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2221/2	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2264/1	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
18741	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
29045	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31308	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-5	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-7	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14573	A	AAAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-3	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
32118	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATATATAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31411	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-11	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14456	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
28952	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31126	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31815	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14464	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATATATAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14864/1	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14575	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
11626	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14591	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31981	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
11601	AA	AAA	-----	GCTGTAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
13145	AA	AAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31422	GA	AAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
31098	AA	AAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
11623/3	AA	AAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2248/2	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2265/1	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2248/1	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14771	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2264/2	AA	AAAAA	-----	GTTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
SVC-4	AC	AAAA	-----	GCTGCAATATATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14568	AATCTTAAAAACACCTTTACATTCTTTTAAGAAT			GCTGCAATTTTATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
2236/3	AATCTTAAAAACACCTTTACATTCTTTTAAGAAT			GCTGCAATTTTATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
13120/2	AATCTTAAAAACACCTTTACATTCTTTTAAGAAT			GCTGCAATTTTATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
13144	AT	AAAAA	-----	GCTGCAATTTTATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC
14538/2	ATATTTTAAAG			GCTGCAATTTTATACAAATCCAAGCCTAGTTT	AA	ACTAGGC

(153-113-ig)

138

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Maráz Annának szakmai útmutatásáért, tanácsaiért, türelméért, támogatásáért, továbbá a lehetőségért, hogy doktori munkámat a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszékén készíthettem el.

Köszönettel tartozom Dr. Janet E.L. Corrynak és Dr. Frieda Jørgensennek, hogy a Bristol Egyetemen lehetőséget biztosítottak számomra a dúsítási vizsgálatok elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni Dr. Kiss Rékának és Dr. Jánosi Szilárdnak a *Campylobacter* izolátumokat, amelyekkel a PCR-alapú molekuláris biológiai vizsgálatokat megvalósíthattam. Köszönet Dr. Luca Cocolinnak és Dr. Kalliopi Rantsiounak (Torinói Egyetem) az *Escherichia coli* mintákért.

Köszönöm kollégáimnak, doktorandusz társaimnak a segítséget és a biztatást. Hálával tartozom Dr. Kovács Mónikának, aki az évek során mind emberileg, mind pedig szakmailag támogatott, és aki a legszebb és a legnehezebb percekben is mindig mellettem állt.

Végül köszönetet szeretnék mondani családomnak és barátaimnak, akik mindvégig bíztak bennem és soha nem szűnő szeretettel támogattak abban, hogy eljuthassak ideig.

Köszönöm!